



**Editor-in-Chief**

Komisarenko S. V., Council Head (Ukraine)

**Deputy Editors:**

Stoika R. S. (Ukraine)

Kolybo D. V. (Ukraine)

**EDITORIAL BOARD**

Levitsky E. L., scientific editor (Ukraine)

Vinogradova A. S., executive secretary (Ukraine)

Honchar M. V. (Ukraine)

Dzyadevych S. V. (Ukraine)

Drobot L. B. (Ukraine)

Filonenko V. V. (Ukraine)

Karpov A. V. (Ukraine)

Kunakh V. A. (Ukraine)

Kuchuk M. V. (Ukraine)

Lukash L. L. (Ukraine)

Matyshevska O. P. (Ukraine)

Melnichuk M. D. (Ukraine)

Minchenko O. G. (Ukraine)

Prylutsky Yu. I. (Ukraine)

Sandomirsky B. P. (Ukraine)

Soldatkin O. P. (Ukraine)

Spivak M. Ya. (Ukraine)

**Головний редактор**

Комісаренко С. В., голова (Україна)

**Заступники головного редактора:**

Стойка Р. С. (Україна)

Колибо Д. В. (Україна)

**РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ**

Левицький Є. Л., науковий редактор (Україна)

Виноградова А. С., відповідальний секретар (Україна)

Гончар М. В. (Україна)

Дзядевич С. В. (Україна)

Дробот Л. Б. (Україна)

Філоненко В. В. (Україна)

Карпов О. В. (Україна)

Кунах В. А. (Україна)

Кучук М. В. (Україна)

Лукаш Л. Л. (Україна)

Матишевська О. П. (Україна)

Мельничук М. Д. (Україна)

Мінченко О. Г. (Україна)

Прилуцький Ю. І. (Україна)

Сандомирський Б. П. (Україна)

Солдаткін О. П. (Україна)

Співак М. Я. (Україна)

**EDITORIAL COUNCIL**

Komisarenko S. V. (Council Head) Ukraine

Blum Ya. B. (Ukraine)

Egorov A. M. (Russia)

El'skaya G. V. (Ukraine)

Kordium V. A. (Ukraine)

Kukhar V. P. (Ukraine)

Miroshnikov A. I. (Russia)

Pidgorsky V. S. (Ukraine)

Severin E. S. (Russia)

Sibirny A. A. (Ukraine)

Sidorov V. A. (USA)

Scriabin K. G. (Russia)

Sozinov O. O. (Ukraine)

Shirobokov V. P. (Ukraine)

**РЕДАКЦІЙНА РАДА**

Комісаренко С. В. (голова) (Україна)

Блюм Я. Б. (Україна)

Егоров О. М. (Росія)

Єльська Г. В. (Україна)

Кордіум В. А. (Україна)

Кухар В. П. (Україна)

Мірошников А. І. (Росія)

Підгорський В. С. (Україна)

Северин Є. С. (Україна)

Сибірний А. А. (Україна)

Сидоров В. А. (США)

Скрябін К. Г. (Росія)

Созінов О. О. (Україна)

Широбоків В. П. (Україна)

**Editorial address:**

Palladin Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine,  
Building 9, Leontovich str., Kyiv, Ukraine, 01601

**Адреса редакції:**

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України,  
вул. Леонтовича, 9, м. Київ, Україна, 01601.

Постановою Президії ВАК України від 27.05.2009 №1-05/2 журнал внесено до Переліку наукових фахових видань для публікації матеріалів дисертаційних робіт за спеціальностями «Біохімія» та «Біотехнологія»

Tel.: (380-44) 235-14-72; E-mail: [biotech@biochem.kiev.ua](mailto:biotech@biochem.kiev.ua); Web-site: [www.biotechnology.kiev.ua](http://www.biotechnology.kiev.ua)

Свідоцтво про державну реєстрацію друкованого засобу масової інформації  
серія КВ №19650-9450ПР від 30.01.2013

Літературний редактор Г. М. Шевченко. Комп'ютерна верстка О. В. Мележик.

Підписано до друку 20.06.2013. Формат 210×297. Папір крейд. 115 г/м<sup>2</sup>.

Гарн. SchoolBookC. Друк — цифровий. Обл.-вид. арк. 13,82. Наклад 200 прим. Замовлення 2/6.

Оригінал-макет підготовлено в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України;

друк — ФОП Москаленко О. М.



# BIOTECHNOLOGIA ACTA

## Scientific journal

*Bimonthly*

Vol. 6, No 3, 2013

### CONTENTS

#### REVIEWS

*Isayenkov S. V.*

The tonoplast transport systems of plant vacuoles  
and their potential application in biotechnology . . . . .9

*Pirog T. P.*

*Khomyak D. I.*

*Grytsenko N. A.*

*Sofilkanych A. P.*

*Konon A. D.*

*Pokora K. A.*

Bacteria of *Nocardia* genus as object of biotechnology . . . . .23

#### EXPERIMENTAL ARTICLES

*Avdiyuk K. V.*

*Varbanets L. D.*

$\alpha$ -Amylases of *Aspergillus flavus* var. *oryzae*  
and *Bacillus subtilis*: the substrate specificity and resistance  
to a number of chemically active substances . . . . .36

*Dudchenko O. Y.*

*Pyeshkova V. N.*

*Soldatkin O. O.*

*Soldatkin O. P.*

*Dzyadevych S. V.*

Enzyme conductometric biosensor  
for fructose determination . . . . .46

*Boiko N. M.*

*Senkiv Yu. V.*

*Shlyakhtina Ye. A.*

*Kluchivska O. V.*

*Skorohid N. P.*

*Mitina N. E.*

*Skorohoda T. V.*

*Moskvin M. M.*

*Zaichenko O. S.*

*Stoika R. S.*

Action of doxorubicin delivered to tumor cells *in vitro*  
and *in vivo* by novel nanoscale oligoelectrolytic carrier . . . .53

<i>Sukach A. N.</i> <i>Liashenko T. D.</i> <i>Shevchenko M. V.</i>	Properties of isolated neural cells from newborn rat in tissue <i>in vitro</i> . . . . .	63
<i>Antonyuk V. O.</i> <i>Panchak L. V.</i> <i>Starykovych M. O.</i> <i>Strutovskaya K. S.</i> <i>Stoika R. S.</i>	Purification and characterization of a new mannose-specific lectin from <i>Hyacinthella acutiloba</i> K. Perss. . . . .	69
<i>Sytar O. V.</i> <i>Gabr A. M.</i> <i>Taran N. Yu.</i> <i>Smetanska I. M.</i>	The phenols accumulation in transformed root cultures of different explants sources of common buckwheat ( <i>Fagopyrum esculentum</i> Moench) . . . . .	75
<i>Maznik K. S.</i> <i>Matvieieva N. A.</i>	Optimization of fructans extraction from <i>in vitro</i> cultivated chicory «hairy» roots . . . . .	83
<i>Voloshko T. E.</i> <i>Fedotov O. V.</i>	Comparative characteristics of basidiomycetes — producers of catalase . . . . .	89
<i>Goraichuk I. V.</i> <i>Bolotin V. I.</i> <i>Gerilovych A. P.</i> <i>Solodyankin O. S.</i> <i>Kucheryavenko R. O.</i> <i>Kucheryavenko V. V.</i>	Detection of the bovine viral diarrhea antibodies . . . . .	95
<i>Mykchaylova O. B.</i> <i>Poyedinok N. L.</i>	Some biological properties of <i>Cordyceps militaris</i> (L.: Fr.) Fr. ( <i>Ascomycota</i> ) mushroom as producer of medicinal substances . . . . .	100
<i>Khrobatenko O. V.</i> <i>Prytul'ska N. V.</i> <i>Shulga S. M.</i>	Creating and investigation of adenosine-5-triphosphate liposomal forms for oral applying . . . . .	110
<i>Boiko S. M.</i> <i>Ryazanova M. E.</i>	Activity dependence of cellulolytic enzymes mono- and dikaryotic cultures of <i>Stereum hirsutum</i> (Wild.) gray ( <i>Basidiomycetes</i> ) from a substratum . . . . .	116
<b>CHRONICLE</b>		
<i>Starovoitova S. A.</i>	Review of international projects in a field of human microbial ecology and construction of probiotics . . . . .	121
<b>NEWS</b> . . . . .		132
<b>NEW PUBLICATIONS ON BIOTECHNOLOGY AND ADJOINING BRANCHES OF SCIENCE</b> . . . . .		
		146

## ЗМІСТ

### ОГЛЯДИ

- Ісаєнков С. В.* Транспортні системи тонопласта рослинних вакуоль та їх потенційне застосування у біотехнології .....9
- Пирог Т. П.  
Хом'як Д. І.  
Гриценко Н. А.  
Софілканич А. П.  
Конон А. Д.  
Покора Х. А.* Бактерії роду *Nocardia* як об'єкти біотехнології .....23

### ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ СТАТТІ

- Авдіюк К. В.  
Варбанець Л. Д.*  $\alpha$ -Амілази *Aspergillus flavus* var. *oryzae* і *Bacillus subtilis*: субстратна специфічність та стійкість до низки хімічно активних речовин .....36
- Дудченко О. Є.  
Пешкова В. М.  
Солдаткін О. О.  
Солдаткін О. П.  
Дзядевич С. В.* Ензимний кондуктометричний біосенсор для визначення фруктози .....46
- Бойко Н. М.  
Сеньків Ю. В.  
Шляхтіна Є. А.  
Ключівська О. В.  
Скорохід Н. Р.  
Мітіна Н. Є.  
Скорохода Т. В.  
Москвін М. М.  
Заїченко О. С.  
Стойка Р. С.* Дія доксорубіцину, доставленого в пухлинні клітини *in vitro* та *in vivo* новим нанорозмірним олігоелектролітним носієм .....53
- Сукач О. М.  
Ляшенко Т. Д.  
Шевченко М. В.* Властивості ізольованих клітин нервової тканини новонароджених щурів у культурі .....63
- Антонюк В. О.  
Панчак Л. В.  
Старикович М. О.  
Струтовська Х. С.,  
Стойка Р. С.* Очищення і характеристика нового манозоспецифічного лектину із цибулин гіацинтника гостролопатевого (*Hyacinthella acutiloba* K. Perss.) .....69

<b>Ситар О. В. Габр А. М. Таран Н. Ю. Сметанська І. М.</b>	Накопичення сполук фенольної природи в культурі трансформованих коренів різних джерел експлантів гречки звичайної ( <i>Fagopyrum esculentum</i> Moench) . . . . .75
<b>Мазник К. С. Матвеева Н. А.</b>	Оптимізація екстрагування фруктанів із культивованих <i>in vitro</i> «бородатих» коренів цикорію . . . . .83
<b>Волошко Т. Є. Федотов О. В.</b>	Порівняльна характеристика базидіальних грибів — продуцентів каталази . . . . .89
<b>Горайчук І. В. Болотін В. І. Герілович А. П. Солодянкін О. С. Кучерявенко Р. О. Кучерявенко В. В.</b>	Виявлення антитіл до збудника вірусної діареї великої рогатої худоби . . . . .95
<b>Михайлова О. Б. Поєдинок Н. Л.</b>	Деякі біологічні властивості гриба <i>Cordyceps militaris</i> (L.: Fr.) Fr. ( <i>Ascomycota</i> ) як продуцента лікарських речовин . . . . .100
<b>Хробатенко О. В. Притульська Н. В. Шульга С. М.</b>	Створення та дослідження ліпосомної форми аденозин-5-трифосфату для перорального застосування . .110
<b>Бойко С. М. Рязанова М. Є.</b>	Залежність активності целюлозолітичних ензимів моно- та дикаріотичних культур <i>Stereum hirsutum</i> (Wild.) gray ( <i>Basidiomycetes</i> ) від субстрату . . . . .116
<b>ХРОНІКА</b>	
<b>Старовойтова С. А.</b>	Огляд міжнародних проектів у галузі мікробної екології людини та створення пробіотиків . . .121
<b>НОВИНИ</b> . . . . .	132
<b>НОВІ ПУБЛІКАЦІЇ З БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА СУМІЖНИХ ДИСЦИПЛІН</b> . . . . .	146

## СОДЕРЖАНИЕ

### ОБЗОРЫ

- Исаенков С. В.** Транспортные системы тонопласта растительных вакуолей и их потенциальное применение в биотехнологии .....9
- Пирог Т. П.  
Хомяк Д. И.  
Гриценко Н. А.  
Софилканич А. П.  
Конон А. Д.  
Покора К. А.** Бактерии рода *Nocardia* как объекты биотехнологии .....23

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Авдюк Е. В.  
Варбанец Л. Д.**  $\alpha$ -Амилазы *Aspergillus flavus* var. *oryzae* и *Bacillus subtilis*: субстратная специфичность и устойчивость к ряду химически активных веществ .....36
- Дудченко А. Е.  
Пешкова В. Н.  
Солдаткин А. А.  
Солдаткин А. П.  
Дзядевич С. В.** Энзимный кондуктометрический биосенсор для определения фруктозы .....46
- Бойко Н. Н.  
Сенькив Ю. В.  
Шляхтина Е. А.  
Ключивская О. Ю.  
Скорохид Н. Р.  
Митина Н. Е.  
Скорохода Т. В.  
Москвин М. М.  
Заиченко А. С.  
Стойка Р. С.** Действие доксорубина, доставленного в опухолевые клетки *in vitro* и *in vivo* новым наноразмерным олигоэлектrolитным носителем .....53
- Сукач А. Н.  
Ляшенко Т. Д.  
Шевченко М. В.** Свойства изолированных клеток нервной ткани новорожденных крыс в культуре .....63
- Антонюк В. О.  
Панчак Л. В.  
Старикович М. О.  
Струтовская Х. С.  
Стойка Р. С.** Очистка и характеристика нового маннозоспецифичного лектина из луковиц гиацинтника остролопастного (*Hyacinthella acutiloba* K. Perss.) .....69

<i>Ситар О. В.</i> <i>Габр А. М.</i> <i>Таран Н. Ю.</i> <i>Сметанская И. Н.</i>	Накопление соединений фенольной природы в культуре трансформированных корней различных источников эксплантов гречки обыкновенной ( <i>Fagopyrum esculentum</i> Moench) .....75
<i>Мазник К. С.</i> <i>Матвеева Н. А.</i>	Оптимизация экстракции фруктанов из культивируемых <i>in vitro</i> «бородатых» корней цикория .....83
<i>Волошко Т. Е.</i> <i>Федотов О. В.</i>	Сравнительная характеристика базидиальных грибов — продуцентов каталазы .....89
<i>Горайчук И. В.</i> <i>Болотин В. И.</i> <i>Герилович А. П.</i> <i>Солодянкин А. С.</i> <i>Кучерявенко Р. А.</i> <i>Кучерявенко В. В.</i>	Обнаружение антител к возбудителю вирусной диареи крупного рогатого скота .....95
<i>Михайлова О. Б.</i> <i>Поединок Н. Л.</i>	Некоторые биологические свойства гриба <i>Cordyceps militaris</i> (L.: Fr.) Fr. ( <i>Ascomycota</i> ) как продуцента лекарственных веществ .....100
<i>Хробатенко А. В.</i> <i>Притульская Н. В.</i> <i>Шульга С. М.</i>	Создание и исследование липосомной формы аденозин-5-трифосфата для перорального применения ....110
<i>Бойко С. М.</i> <i>Рязанова М. Е.</i>	Зависимость активности целлюлозолитических энзимов моно- и дикариотических культур <i>Stereum hirsutum</i> (Wild.) gray ( <i>Basidiomycetes</i> ) от субстрата .....116
<b>ХРОНИКА</b>	
<i>Старовойтова С. А.</i>	Обзор международных проектов в области микробной экологии человека и создания пробиотиков .....121
<b>НОВОСТИ .....132</b>	
<b>НОВЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО БИОТЕХНОЛОГИИ И СМЕЖНЫМ ДИСЦИПЛИНАМ ...146</b>	



УДК 57.023 581.1

# ТРАНСПОРТНІ СИСТЕМИ ТОНОПЛАСТА РОСЛИННИХ ВАКУОЛЬ ТА ЇХ ПОТЕНЦІЙНЕ ЗАСТОСУВАННЯ У БІОТЕХНОЛОГІЇ

С. В. ІСАЄНКОВ

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки» НАН України, Київ

*E-mail: stan.isayenkov@gmail.com*

Отримано 25.01.2013

В огляді аналізується роль рослинних вакуоль у життєдіяльності рослин, зокрема в підтриманні клітинного тургорного тиску, зберіганні мінералів та поживних речовин. Описано головні механізми транспорту через мембрану вакуолі. Наведено основні типи транспорту поживних речовин, важких металів, вітамінів та органічних сполук через тонопласт вакуоль. Розглянуто головні системи мембранного транспорту рослинних вакуоль, їхні фізіологічні функції та охарактеризовано найвідоміші транспортні протеїни вакуоль.

Обговорюються значення та роль транспорту сполук різної природи у вакуолі для життєдіяльності рослини. Описано головні типи рослинних вакуоль та їхню роль у функціонуванні рослини. Розглянуто сучасний стан досліджень транспорту рослинних вакуоль. Подано приклади використання принципів та механізмів вакуолярного транспорту в різних галузях біотехнології рослин. Окреслено перспективи нових напрямів і підходів у розвитку біотехнології рослин і застосуванням різних типів вакуоль та систем мембранного вакуолярного транспорту.

**Ключові слова:** вакуоля, тонопласт, мембранний транспорт, канали, транспортери, біотехнологія.

Більшість рослинних клітин містять одну чи навіть декілька вакуоль, що можуть займати до 90% об'єму клітини [1]. Вакуолі рослинних клітин є важливими клітинними органелами для перебігу багатьох фізіологічних процесів у рослині. Вакуолі рослин відіграють істотну роль у зберіганні важливих мінералів, поживних речовин та протеїнів. Функціонування цих клітинних органел є вкрай необхідним для зміни об'єму клітини у процесі росту та розвитку рослини, відкриття і закриття продихових клітин та підтримання тургорного тиску, що зміцнює механічну жорсткість зелених тканин рослин. Вакуолі рослинних клітин є одним із головних депо іонів  $Ca^{2+}$ . Тому окрім «класичних» функцій зберігання, генерації тургору та гідролізу вакуолі рослинних клітин беруть активну участь у клітинному сигналіngu [2]. Вони відокремлені від цитозолу за допомогою вакуолярної мембрани, що отримала назву тонопласт. Головними елементами вакуолярного соку рослинних клітин є солі неорганічних сполук і вода. Завдяки

пластичності та мультифункціональності вакуоль рослинні клітини здатні значно збільшувати свій об'єм і розміри, накопичувати в собі багато різноманітних солей та води із навколишнього середовища [1]. Такий широкий спектр функцій і пластичність цих клітинних органел роблять їх привабливими для використання в різноманітних напрямках біотехнології. Хоча більшість рослинних клітин містить велику центральну літичну вакуоль (ЛВ), деякі типи клітин дуже часто мають інший тип вакуоль, набагато менший за розмірами, ніж ЛВ (рис. 1, 2). Ці вакуолі отримали назву протеїнових вакуоль (ПВ) (PSV, Protein storage vacuoles). Якщо ЛВ є еквівалентами лізосом тваринних клітин та вакуоль дріжджів, то походження ПВ ще не з'ясовано [2]. Транспорт через тонопласт вакуоль є одним із найважливіших процесів, що забезпечує виконання цими клітинними органелами своїх фізіологічних функцій. Окрім того, слід зазначити, що вивчення транспортних систем тонопласта вакуоль відкриває нові перспективи

для використання цих органел як клітинних «біореакторів» для зберігання й накопичення важливих біологічно активних сполук, що включають токсини, фармпрепарати, вітаміни та мінерали.

**Протонні помпи рослинних вакуоль.** Рух через тонопласт забезпечується роботою протонних помп, що створюють електрохімічний градієнт. Рослинні вакуолі мають два типи протонних насосів — V-АТФази та V-пірофосфатази [1–4]. V-АТФази — мультимерні комплекси, що є характерними для тонопласта клітин вищих рослин та грибів, а також для мембрани лізосом клітин ссавців [5]. V-АТФази — головні компоненти закислення вакуолярного соку ЛВ [2] (рис. 1, А). Вакуолі рослинних клітин мають пірофосфатази, що також забезпечують закислення вакуолярного соку.  $H^+$ -пірофосфатази було знайдено у багатьох представників рослинного царства — водоростей, мохів, папоротей [6, 7]. Гомологічні до  $H^+$ -пірофосфатаз

протеїни ідентифіковано у деяких бактерій, однак цей тип протонних помп відсутній у клітинах тварин і грибів.  $H^+$ -пірофосфатази тонопласта рослинних вакуоль є невеликим мономером, активність якого залежить від присутності іонів  $Mg^{2+}$ . Цікавим фактом є те, що існують дві ізоформи цього протеїну, один із них активується іонами  $K^+$ , тимчасом як інша ізоформа не потребує наявності цього іона [8]. Хоча загальний рН ПВ є нейтральним,  $H^+$ -пірофосфатазу було виявлено у мембрані глобоїдів, що мають кисле значення рН порівняно з вакуолярним соком ПВ [9] (рис. 2). Відповідно до хімічно-осмотичної моделі енергозалежного транспорту розчинних сполук створення протонного електрохімічного градієнта тонопласта вакуоль забезпечується роботою V-АТФаз чи  $H^+$ -пірофосфатаз. Створення такого електрохімічного градієнта є головною рушійною силою транспорту через мембрану тонопласта багатьох сполук, зокрема цукрів, аміно-

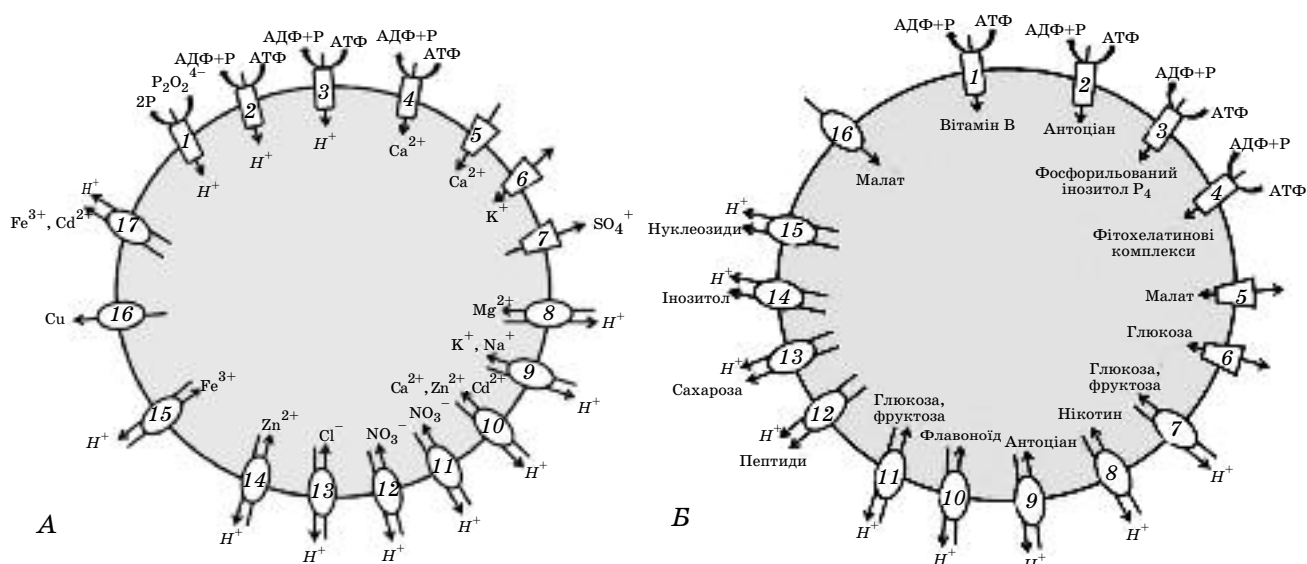
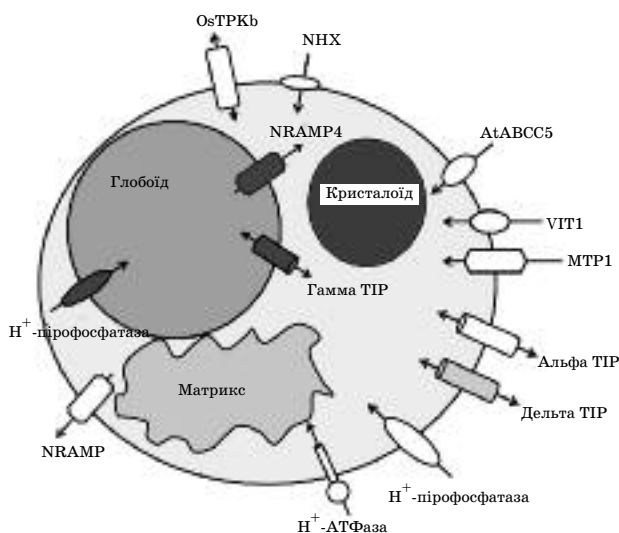


Рис. 1. Система транспорту через тонопласт літичних вакуоль:

А — транспорт неорганічних сполук: 1 — пірофосфатаза; 2 — протонна АТФаза V-типу; 3 — АНА10 — протонна АТФаза Р-типу; 4 — АСА4 та АСА11 —  $Ca^{2+}$ -залежні АТФази Р-типу; 5 — ТРК1 — канал для  $Ca^{2+}$ ; 6 — ТРК1, -2, -3 та -5 — канали для  $K^+$ ; 7 — AtSUTR4-1 та -2 — експортери сульфатів; 8 — MGT — імпортер  $Mg^{2+}$ ; 9 — NHX — обмінники  $K^+$  та  $Na^+$ ; 10 — САХ1, -3, -4, та -9 — імпортери  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  та  $Ca^{2+}$ ; 11 — CLCa — протонний обмінник  $NO_3^-$ ; 12 — NRT2.7 — протонний обмінник  $NO_3^-$ ; 13 — CLCс — протонний обмінник  $Cl^-$ ; 14 — MTP1 і -3 — протонні обмінники  $Zn^{2+}$ ; 15 — COPT5 — експортер Cu; 16 — NRAMP4 і -5 — протонні симпортери  $Cd^{2+}$  або  $Fe^{3+}$ ; 17 — VIT1 — протонний обмінник  $Fe^{3+}$ .

Б — транспорт органічних сполук: 1 — АВСС — транспортер антоціанів; 2 — АВСС1 і -4 — транспортери вітаміну групи В; 3 — АВСС-1 і -2 — транспортери хелатинів і желатинових комплексів; 4 — АВСС5 — транспортер фосфоінозитолів  $P_6$ ; 5 — ALMT4, -5, -6 і -9 — канали для малатів та фумаратів; 6 — ELS1 — пермеаза глюкози; 7 — VGT1 — протонний обмінник глюкози та фруктози; 8 — JAT1 — протонний обмінник нікотину МАТЕ-типу; 9 — TT12 — протонний обмінник антоціанів МАТЕ-типу; 10 — DTX35 — протонний обмінник флавоноїдів МАТЕ-типу; 11 — TMT1 — протонний обмінник глюкози, фруктози та сахарози; 12 — PTR2 — протонний симпортер пептидів; 13 — SUC4 — протонний симпортер сахарози; 14 — INT1 — протонний симпортер інозитолу; 15 — ENT1 — протонний симпортер нуклеозидів; 16 — TDT — транспортер малату та фумарату



**Рис. 2. Система мембранного транспорту протеїнових вакуоль**

Наведено ідентифіковані мембранні транспортери

кислот, катіонів та аніонів мінеральних сполук [2]. Підсилення експресії генів, що кодують вищезазначені протонні помпи, та роботи цих pomp у тонопласті може призводити до збільшення протонного електрохімічного градієнта, активізуючи тим самим пасивний транспорт мінеральних сполук у вакуолі (рис. 1, 2).

**Системи транспорту аніонів.** Іонні канали відіграють важливу роль у транспорті мінеральних сполук через тонопласт відповідно до створеного електрохімічного градієнта. Представники іонних каналів тонопласта стали одними з перших протеїнів вакуоль, що їх було детально охарактеризовано [10–12]. Багато досліджень здійснено для характеристики функцій неселективних та  $K^+/Ca^{2+}$ -селективних катіонних каналів [2]. Проте зовсім мало робіт, що описують функції та роботу аніонних каналів. Відомо всього декілька досліджень з вивчення функціонування транспортних каналів малату,  $Cl^-$  та  $NO_3^-$  [13, 14]. Механізми транспорту через тонопласт можуть відрізнятися і для клітин з різних типів рослинних тканин, і різних типів вакуоль. Великого прогресу в дослідженні вакуолярних транспортних протеїнів було досягнуто за останні роки завдяки декільком дослідженням протеому вакуоль та аналізу мутантів рослин [15, 16] (рис. 1).

Роль аніонних каналів вакуолярної мембрани у підтриманні мінерального гомеостазу, відповіді на абіотичні та біотичні стреси ще залишається майже невідомою. Існує

декілька ранніх робіт, що свідчать про суттєве накопичення  $Cl^-$  та малату у вакуолях за умов сольового стресу [13]. Відомо, що похідні малату беруть участь у багатьох важливих процесах у цитоплазмі, гліоксісомах та хлоропластах [14]. Рослини із САМ-метаболизмом використовують малат для зберігання  $CO_2$ , що вивільняється протягом прохолодної ночі і таким чином допомагає запобігати істотним втратам води рослиною [2]. Дослідження електрофізіологічних показників вакуоль мезофілу САМ-рослин *Kalanchoe daigremontiana* показали значне надходження малату всередину вакуолі [17]. Малат та цитрат є головними похідними органічних кислот, що накопичуються у великих кількостях у вакуолярному соку [1]. Біохімічні експерименти вказують на те, що один і той самий транспортний протеїн відповідає за транспорт більшості карбогідратів [1]. Після відкриття транспортеру малату було показано, що цей транспортний протеїн є близьким гомологом транспортера дикарбоксилату натрію AtTDT (*A. thaliana* tonoplast dicarboxylate transporter) (рис. 1, B) [1]. Завдяки подальшим дослідженням вакуолярного транспорту було ідентифіковано вакуолярний канал малату, що належить до родини транспортерів металу ALMT (Aluminium tolerance metal transporters) [18, 19]. Геном арабідопсису містить 15 генів, що кодують ALMT-транспортери [19]. Хоча функції більшості ізоформ AtALMT транспортерів із арабідопсису ще не з'ясовано, було встановлено, що саме AtALMT9 локалізується в тонопласті й відповідає за транспорт малату у вакуолях клітин мезофілу [19]. Мутантні лінії рослин за геном AtALMT9 демонструють незначне зменшення вмісту малату у вакуолях. Такі несуттєві зміни у фенотипі мутантних рослин можна пояснити функціонуванням у вакуолях цих клітин ще AtTDT-подібного транспортеру малату AtTDT [2, 19] (рис. 1).

Інша велика група аніонних каналів вакуоль належить до родини CLC (Chloride channels). Роль цих каналів і досі є майже невідомою. Проте відомо, що нітрати можуть зберігатись у вакуолях у досить високих концентраціях [1]. Для того аби забезпечити таке накопичення у вакуолях, рослинна клітина залучає до роботи транспортні протеїни родини CLC. Нещодавно було показано, що один із протеїнів родини CLC бере участь у транспорті нітратів [20]. Після детального аналізу CLC-мутантів арабідопсису було виявлено, що саме CLCs відповідає за регуляцію рівня нітратів у тканинах

рослин [20]. Мутації за цим геном призводили до зниження накопичення нітратів у тканинах рослин [20]. Цікавим фактом є те, що вміст інших аніонів, зокрема малату, цитрату та хлориду, був нижчий у мутантів лінії *clsc*. Слід зазначити, що мембранну локалізацію CLCс ще не повністю з'ясовано. Залишається невідомим, де локалізується CLCс — у тонопласті чи в плазматичній мембрані [2]. Було показано, що *AtCLCa* впливає на обмін та гомеостаз нітратів у рослин [21]. Мутантні лінії арабідопсису за цим геном чутливі до дії нітратів у високих концентраціях. Було встановлено, що *Atclca* мають більшу чутливість до дії гербіцидів. Вважають, що більшість CLC-протеїнів є аніонними каналами, проте було показано, що *AtCLCa* є  $\text{NO}_3^-:\text{H}^+$  антипортером (рис. 1) [21]. Достатньо лише незначних змін в амінокислотній послідовності CLC-каналу (E148 та E202), щоб перетворити цей CLCa на транспортер [21]. Цікавим фактом є те, що канал *AtCLCс* має високу ступінь гомології з тваринним CLC-5, який є протонно-хлоридним обмінником ( $2\text{Cl}^-:\text{H}^+$ ), що функціонує в клітинах нирок [2]. Було продемонстровано, що тільки заміна однієї амінокислоти на іншу в CLC-5 є достатньою, аби змінити спеціалізацію цього обмінника і перетворити його на протонно-нітратний обмінник ( $\text{NO}_3^-:\text{H}^+$ ) [22]. Дослідження CLC-каналів у рослинах рису показали, що *OsCLC-1* та *OsCLC-2* відповідають за обмін і гомеостаз аніонів  $\text{Cl}^-$  у рослинах [23, 24].

Окрім нітратів та хлоридів вакуолі рослин накопичують аніони сульфату. Тільки два транспортери сульфату, а саме *SULTR4-1* та *SULTR4-2*, відомі на сьогодні. Ці сульфатні транспортери відповідають за експорт сульфатів із вакуоль у цитоплазму в клітинах кореня та гіпокотилу [25]. Таким чином, подальше вивчення транспорту аніонів через мембрану вакуоль може допомогти у багатьох напрямках рослинної біотехнології, зокрема детоксифікації ґрунтів від нітратів, підвищення солестійкості рослин шляхом посилення транспорту іонів  $\text{Cl}^-$  у вакуолі та ін. (рис. 1, А).

**Системи транспорту катіонів.** Топопласт рослинних вакуоль містить різноманітні за своїми характеристиками та функціями катіонні канали і транспортери. Клітини рослин мають дві родини каналів, що регулюються лігандами (LGC, Ligand gated channels). Першою родиною є канали, подібні до рецепторів глутамату (GLR, Glutamate receptor like), другою — канали, що регулюються циклічними нуклеотидами (CNGC,

Cyclic nucleotide gated channels) [2]. Функції деяких із цих каналів було добре вивчено. Зокрема показано, що CNGC-канал з бере участь у транспорті катіонів [26]. Проте остаточно мембранну локалізацію цього CNGC-каналу ще не з'ясовано. Існує декілька повідомлень, що свідчать про участь LGC-каналів рослин у сигнальних процесах клітин, зокрема у вивільненні іонів  $\text{Ca}^{2+}$  із вакуоль та інших мембранних резервуарів клітини [27]. Було показано, що продукт фосфатінозитольного сигнального шляху — інозитол 1,4,5-трифосфат ( $\text{IP}_3$ , inositol 1,4,5-triphosphate) може вивільняти  $\text{Ca}^{2+}$  з ізольованих вакуоль [28]. Разом із вищезазначеним дослідженням існує ще декілька робіт, що свідчать про існування  $\text{IP}_3$ -каналу у вакуолях рослин [29, 30]. Окрім експериментальних доказів існування вакуолярного  $\text{IP}_3$ -каналу, деякі дослідження вказують на існування іншого типу LGC-каналів у тонопласті вакуоль. Було показано, що циклічна АДФ-рибоза (цАДФ) також може стимулювати вивільнення іонів  $\text{Ca}^{2+}$  із вакуоль червоного буряку [29]. Фармакологічні дослідження цього каналу свідчать про подібність останнього до ріанодинового рецептора тваринних клітин [29]. Проте нещодавно проведена робота показала відсутність будь-якої стимуляції вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  із вакуоль за допомогою цАДФ [31]. Слід також зазначити, що окрім функції вивільнення іонів  $\text{Ca}^{2+}$  LGC-канали, а саме родина CNGC, бере участь у транспорті іонів  $\text{Na}^+$  [32] (рис. 1, А).

Транспорт іонів  $\text{Ca}^{2+}$  через мембрану вакуоль можуть забезпечувати також інші транспортні протеїни. Зокрема, нещодавно було відкрито канал транспорту іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , що отримав назву TPC (Two pore channel) [33]. Цей канал складається із 12 трансмембранних доменів, двох EF-доменів зв'язування із  $\text{Ca}^{2+}$  та потенційного 14-3-3 сайту зв'язування із 14-3-3 протеїнами [2, 33]. Завдяки аналізу *Attpc1* мутантів арабідопсису було з'ясовано участь *AtTPC1* у закритті продихів, що залежить від концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозолі та в пов'язаному з дією абсцизинів процесі проростання насіння [33]. Мутації гена *TPC* у рослинах рису призводили до зниження чи гальмування відповіді на дію еліситорів (ксиланаз) та індукції процесів гіперчутливої відповіді [34]. Подібний до рослин рису фенотип спостерігався і для суспензійної культури тютюну BY-2 [35]. Таким чином, TPC-1 може брати участь у сигнальних процесах, що пов'язані із захистом рослин від патогенів, проростання насіння та закритті клітин продихів (вод-

ному стресі). Після відкриття каналів цього типу в науковій спільноті виникла велика полеміка з приводу  $\text{Ca}^{2+}$ -специфічності та вакуолярної локалізації ТРС-каналів. Однак низка останніх досліджень із застосуванням підходів вакуолярної протеоміки, мічення антитілами та ТРС:GFP-злиттям свідчать про те, що ТРС-канали є специфічними для іонів  $\text{Ca}^{2+}$  і розташовані в тонопласті рослинних вакуоль [36–42]. Слід зазначити, що ТРС-канали належать до SV-типу (slow vacuolar channel) [2] (рис. 1, А).

Калієві канали вакуоль було ідентифіковано завдяки електрофізіологічним дослідженням калієвих струмів клітин продохів [43]. Нещодавно було показано, що вакуолярні калієві канали родини ТРК (Two pore  $\text{K}^+$  channel) належать до VK-типу (vacuolar  $\text{K}^+$  selective) та локалізовані і в клітинах продохів, і в інших типах клітин рослин [44]. Окрім AtTRK1, геном арабідопсису містить ще 4 гени, що кодують інші ізоформи ТРК-каналів (AtTRK2, 3, 4, 5) [44, 45]. Усі форми AtTRK з арабідопсису, за винятком AtTRK4, локалізовані у тонопласті вакуоль [2, 44, 45, 46]. На відміну від своїх родичів, AtTRK4 розташований у плазматичній мембрані [47]. Подібні за своїми характеристиками ТРК-канали було знайдено в геномах інших видів рослин, зокрема рису, ячменю, тютюну, *Physcomitrella* та ін. [2, 47, 48]. Канали ТРК є невеликою родиною транспортних протеїнів з переважно вакуолярною локалізацією та селективністю до  $\text{K}^+$ . Типовий ТРК-канал має 4 трансмембранних домени, дві пори з характерною комбінацією амінокислот — GYGD, що відповідає за селективність цих пор для іонів  $\text{K}^+$  [2, 46]. Окрім того, більшість ТРК-каналів мають EF-мотиви у С-термінальному кінці та 14-3-3 мотив у N-термінальному кінці. Тому ці канали можуть регулюватись як іонами  $\text{Ca}^{2+}$ , так і 14-3-3 протеїнами [2, 46, 47, 49]. Цікавим фактом є те, що одна з ізоформ тютюну NtTRK1 може мати варіації в амінокислотній послідовності у другій порі — замість канонічної GYGD-послідовності друга пара містить VHGD чи GHGD [50]. Найбільш дослідженим ТРК-каналом є AtTRK1 [44]. Було встановлено, що функція AtTRK1 є важливою для закриття продохів, проростання насіння та індукції осмотичного стресу [44]. Інші ізоформи з арабідопсису AtTRK2, AtTRK3, AtTRK5 мають вакуолярну локалізацію, але функціональність цих каналів ще до кінця не з'ясовано [2, 46]. Цікавим відкриттям була відмінність у вакуолярній локалізації двох ізоформ

ТРК-каналів із рису [46, 51]. Встановлено, що OsTRKa міститься в тонопласті ЛВ, проте OsTRKb локалізується на мембрані ПВ [51]. Така різниця у вакуолярній локалізації ТРК-каналів свідчить про різноманіття фізіологічних функцій вакуоль рослин. OsTRKb є спеціалізованим каналом ПВ і відіграє важливу роль у процесах формування та проростання насіння. Окрім того, дані свідчать про те, що експресія OsTRKb зростає в умовах сольового стресу [46]. Імовірно, OsTRKb не тільки є важливим детермінантом гомеостазу  $\text{K}^+$  в насінні та репродуктивних органах рослин, але й відповідає за формування відповіді на дію сольового стресу [32, 46] (рис. 1, А; 2).

Интерес становить група вакуолярних транспортних протеїнів  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -антипортерів, що транспортують  $\text{Na}^+$  та, можливо, калій у вакуолі [32, 52]. Транспортні родини NHX було знайдено й охарактеризовано для багатьох видів рослин [53–57] (рис. 1, А; 2).

Найбільш детально описано AtNHX1 з арабідопсису, що є одним із головних детермінантів стійкості рослин до сольового стресу [55, 58]. Наприклад, експресія AtNHX1 у томатах значно підвищує солестійкість рослин, такі томати здатні формувати ягоди за концентрації солей, що є летальною для рослин дикого типу [55]. Подібні ефекти підвищення солестійкості показано також для OsNHX1 із рису [59, 60]. Геном арабідопсису містить шість генів цієї родини — AtNHX1-6 [61]. Кожен представник родини NHX з арабідопсису по-різному реагує на дію абсцизину та високих концентрацій  $\text{NaCl}$  [61]. NHX-транспортні поділяють на два класи — I та II. NHX-обмінники класу I мають ЛВ-специфічну локалізацію, а транспортні класу II містяться або у превакуолярних компартментах, або в інших ендосомальних компартментах клітин [62, 63]. Дослідження NHX-обмінників показали, що антипортери класу I є насправді  $\text{K}^+/\text{H}^+$ -обмінниками [63].

Таким чином, експериментальні дані свідчать на користь того, що NHX-транспортні класу I в нормальних умовах беруть участь у поглинанні іонів калію у вакуолях для генерації тургору, регуляції рН та зберігання  $\text{K}^+$  [32]. Вони також мінімізують токсичні ефекти сольового стресу й осмотичного шоку, транспортуючи іони  $\text{K}^+$  та в деяких випадках  $\text{Na}^+$  у вакуолі, і таким чином підтримують відповідний баланс іонів калію стосовно іонів натрію в цитозолі [63].

Тонопласт вакуоль рослинних клітин також містить  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортні, що отримали назву SAХ (cation/ $\text{H}^+$  exchangers). Перші

кДНК САХ-транспортів було клоновано із рослин арабідопсису. Функцію САХ як  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -обмінників продемонстровано за допомогою комплементації мутантів дріжджів кДНК цих транспортів [64]. Два гени, що їх уперше знайдено в арабідопсисі, дістали назви — САХ1 та САХ2 [64]. Було показано активацію САХ1 на дію холодостресу. САХ1 бере участь у регуляції експресії генів, що відповідають за холодостійкість рослин [1].

САХ1 та САХ2 є  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортерами, однак згодом було встановлено, що деякі інші представники родини САХ можуть транспортувати не тільки іони  $\text{Ca}^{2+}$ , але й іони інших металів. Потенційними субстратами для різних представників САХ-транспортів є іони кадмію, марганцю, ртуті, цинку, нікелю і навіть срібла [1, 64–66] (рис. 1, А; 3).

Окрім САХ-транспортів, транспортування металів через тонопласт вакуолю можуть забезпечувати транспортери родини NRAMP (Natural resistance-associated macrophage proteins). Цю родину транспортів металів добре охарактеризовано для клітин ссавців. Здебільшого NRAMP-транспортери відповідають за транспорт бівалентних іонів

[67, 68]. Гени NRAMP-транспортів ідентифіковано для великої кількості видів рослин [68–71]. Дослідження функцій AtNRAMP3 з арабідопсису показали, що він локалізований у вакуолярній мембрані й відповідає за експорт іонів заліза із вакуолю. Мутантні лінії арабідопсису з порушеною функцією AtNRAMP3 виявляють стійкість до впливу кадмію і збільшують накопичення марганцю та цинку в умовах дефіциту заліза [72, 73]. Підсилення експресії AtNRAMP3 призводить до пригнічення накопичення марганцю [72, 73]. Транспортери родини САХ та NRAMP можуть набути широкого застосування у технологіях фітореMediaції та біофортифікації (рис. 3).

Попередні дослідження транспорту металів у клітинах рослин виявили транспортну активність для іонів металів у вакуолярній мембрані [74]. Було ідентифіковано протонно-магнієвий обмінник родини AtMNX та вакуолярний імпортер іонів цинку ZAT1 (Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana*) родини CDF (Cation diffusion facilitator) [75, 76]. В останні роки знайдено декілька вакуолярних імпортерів важких металів родини MTP (metal tolerance protein) та HMA3

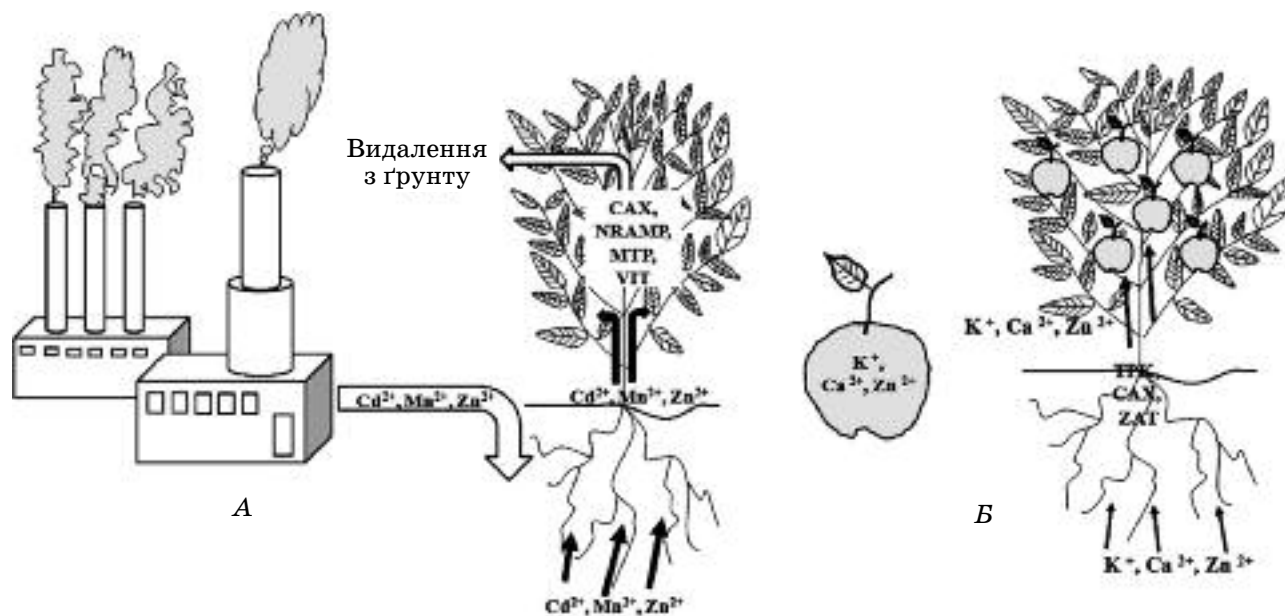


Рис. 3. Використання транспортних протеїнів рослинних вакуолей у біотехнології рослин:

А — варіанти фітореMediaції ґрунтів за допомогою генетично модифікованих рослин, що експресують/оверекспресують гени родин САХ, NRAMP, MTP, VIT. Рослини із розгалуженою кореневою системою трансформують одним чи декількома із вищезазначених генів. Трансформовані рослини здатні транспортувати важкі метали ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ). Стебло та листя накопичують у своїх тканинах ці важкі метали. Стебло та листя рослин може бути зібрано для подальшої утилізації.

Б — варіанти біофортифікації рослин за допомогою транспортних протеїнів тонопласта. Цінні харчові культури рослин можуть бути трансформовані генами TPK, САХ, ZAT під контролем специфічного для фруктів промотору. Транспортні протеїни TPK, САХ, ZAT сприятимуть накопиченню цінних мінеральних елементів ( $\text{K}^{+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) у вакуолях фруктів та поліпшенню харчової цінності рослин

(Heavy metal ATPase 3) [77, 78]. Функціонування транспортеру MTP1 забезпечує, зокрема, виживання рослин в умовах забруднення ґрунтів цинком [77]. Нещодавно було показано, що AtHMA3 з арабідопсису є Р-типом АТФази і сприяє функціонуванню вакуолярного імпортера кадмію, цинку, кобальту та свинцю [78]. Існує припущення, що експорт цинку, інших металів та мінералів із ПВ забезпечується роботою HMA-помп та NRAMP-транспортерів [79]. Більш того, транспорт іонів металів у ПВ відбувається за рахунок функціонування MTP-імпортерів та VIT-транспортерів (vacuole iron uptake transporter) [79]. Було також встановлено, що і мембрана глободу ПВ, і тонопласт ЛВ містять транспортер металу NRAMP4 (рис. 1, А; 2; 3) [52, 80].

Тільки один із представників транспортерів міді родини СОРТ (copper transport protein) — СОРТ5 виявлено в тонопласті вакуоль [81, 82]. Мутанти арабідопсису із втраченою функцією СОРТ5 накопичують більше міді в коренях. Спостерігається також менший вміст міді у стеблі. Вміст міді у вакуолях, виділених із клітин мутантних рослин, був значно вищий. Ці результати свідчать на користь того, що СОРТ5 є експортером міді з вакуоль [81].

**Системи транспорту цукрів.** Вакуолярна мембрана бере участь у транспорті різноманітних типів цукрів. Молекули сахарози транспортуються у вакуолі й накопичуються у великих кількостях у клітинах цукрового буряка за допомогою механізму протонного антипорту [1]. Дифузія сахарози у вакуолі спостерігається також для клітин тканин ячменю, томатів та цукрової тростини [1]. У багатьох рослин сахароза вакуолярного соку дуже швидко перетворюється на фруктани чи інші складні полімери, що надалі залишаються у цьому клітинному резервуарі [1]. У такому разі енергія, що потрібна для транспорту та накопичення карбогідратів, надходить завдяки розщепленню хімічного зв'язку між глюкозою та фруктозою [1]. Завдяки інтенсивним дослідженням протеома й транскриптома, регуляції та транспорту вакуоль було ідентифіковано 4 різних транспортери глюкози, що забезпечують імпорт глюкози у вакуоль [15, 16, 83]. На сьогодні ідентифіковано лише один експортер сахарози, тому вивчення вакуолярного транспорту цукрів є важливим і перспективним напрямом досліджень [1, 15, 16, 83]. Дослідження транспорту сахарози через мембрану вакуолі дали змогу

виявити декілька типів транспортних протеїнів, що беруть участь у цьому процесі. Було показано, що протонно-сахарозний симпортер AtSUC4 відповідає за експорт сахарози із вакуоль (рис. 1, В) [84, 85]. Зворотний рух молекул сахарози із вакуоль до цитоплазми забезпечується транспортними системами протонного антипорту, зокрема TMT1 і TMT2 [84, 85]. Серед усіх членів родини SUC/SUT (Sucrose carriers/transporters) і TMT (tonoplast monosaccharide transporter) тільки AtSUC4 та TMT1/2 мають вакуолярну локалізацію [84, 85]. Більш того, дослідження протеома вакуолярних мембран ячменю вказують на те, що гомолог AtSUC4 з ячменю — HvSUT2 також має вакуолярну локалізацію [86, 87]. Припускають, що експорт молекул глюкози та інших моносахаридів із вакуолі в цитоплазму забезпечується протонними симпортерами родини VGT (Vacuolar glucose transporter) [88, 89]. На сьогодні відомо тільки два представники цієї родини — VGT1 та VGT2, однак функціональні характеристики цих транспортерів ще невідомі (рис. 1, В).

**Транспорт органічних сполук та метаболітів за допомогою АВС-транспортерів.** Дослідження фізіології транспорту рослинних вакуоль уможливили ідентифікацію групи транспортних протеїнів суперродини АВС-транспортерів, що забезпечують транспорт органічних сполук і метаболітів. Транспорт сполук через систему вакуолярних АВС-транспортерів потребує енергії гідролізу MgАТФ [90]. Загалом АВС-транспортери вакуоль забезпечують транспорт кон'югатів із глутатионом та метаболітів [3].

Такі енергозалежні «насоси» можуть «закачувати» у вакуолі сполуки різноманітної природи. Вони відповідають за транспорт цукрів, пептидів, деяких неорганічних іонів, важких металів [3]. АВС-транспорт допомагає рослинам накопичувати у вакуолях токсичні сполуки, зокрема феноли та алкалоїди, які мають репелентні властивості й використовуються рослиною як «біологічна зброя» у боротьбі з атаками комах та мікроорганізмів. Окрім того багато токсичних сполук ксенобіотичної природи (пестициди та інші) можуть бути модифіковані й утилізовані рослиною у центральних ЛВ [1–3]. Нещодавно було продемонстровано, що АВС-транспортери родини МАТЕ (Multidrug and toxic compound extrusion) відповідають за вакуолярний експорт антоціанів та нікотину. МАТЕ-транспортер — ТТ12 є флавоноїд-протонним антипортером і виявляє активність у клітинах оболонки насіння

арабідопсису [91]. Цікавим фактом є те, що геном арабідопсису містить 56 генів, які кодують МАТЕ-транспорттери, а геном людини — тільки два гени [88]. Одне з перших спостережень того, що вакуолярний транспорт флавоноїдів та антоціанів забезпечується роботою ABC-транспорттерів, було стосовно жита (*Secale cereale*) та рослин арабідопсису [92, 93]. Зокрема, встановлено, що AtMRP2/AtABCC2 діє як транспорттер кон'югатів глюкоронату [93]. Було з'ясовано також, що транспорт глікозилізованих антоціанів у вакуолі забезпечується роботою ABC-транспорттера MRP-типу (Multidrug resistance protein) у рослинах кукурудзи [94]. Глікозилування ксенобіотичних сполук чи створення кон'югатів із глутатіоном є одним із механізмів детоксифікації клітини. Видалення і транспорт у вакуолі глутатіонових кон'югатів відбувається виключно за рахунок гідролізу АТФ. Було виявлено декілька генів, що кодують протеїни транспорту глутатіонових кон'югатів у рослин. Усі ці транспортні протеїни належать до ABC-родини і мають відповідні гомологи в клітинах ссавців та дріжджів [95, 96]. Цікавим фактом є те, що, на відміну від клітин ссавців чи грибів, де глутатіонові кон'югати транспортуються до плазматичної мембрани та екскретуються у міжклітинний простір, клітини рослин транспортують кон'югати цього типу у вакуолі [1]. Багато продуктів деградації метаболізму клітин можуть також продукувати високореактивні типи вільних радикалів. Існування таких радикалів у метаболічно-активній частині клітини — цитозолі — є вкрай небезпечним. Тому утилізація таких продуктів розпаду та деградації у вакуоль за допомогою MRP-транспорттерів є дуже важливою. Детоксифікація деяких сполук ABC-транспорттерами у рослин було показано для транспорттерів MRP-типу [90]. Відомо, що сполуки важких металів можуть бути детоксифіковані за допомогою фітохелатинів і утилізовані у вакуолях. Нещодавно виявлено два нових представники MRP-транспорттерів, що забезпечують транспорт фітохелатинових комплексів, зокрема із миш'яком до вакуоль [96]. ABC-транспорттери також відіграють важливу роль у функціонуванні ПВ. Зокрема, для рослин кукурудзи та сорго було показано, що накопичення фітату у глобоїдах ПВ відбувається завдяки ABC-транспорттерам MRP-типу (рис. 2) [97]. Нещодавно з'ясовано, що накопичення фітату в насінні арабідопсису відбувається за допомогою спеціалізованого ABC-транспорттеру AtABCC5

(рис. 2) [98]. ABC-транспорттери також забезпечують транспорт вітамінів групи B9 у вакуолі клітин рослин. Відомі два ABC-транспорттери з арабідопсису — AtABCC1, що транспортує фолати, та AtABCC4, який транспортує антифолати до вакуоль (рис. 1, B) [99, 100]. ABC-транспорттери мають великий потенціал для використання у технологіях вакуолярної утилізації токсичних органічних сполук. Більш того, ABC-транспорттери є головними транспортними протеїнами вакуоль, що відповідають за транспорт великих органічних сполук. Така властивість цих транспортних протеїнів уможливорює використання їх у накопиченні та зберіганні у вакуолях різноманітних ксенобіотиків (рис 1, B).

**Транспорт води за допомогою аквапоринів.** Центральна вакуоль рослинної клітини може займати до 90% її об'єму, тому вакуолі рослин мають велике значення для зберігання води і відіграють одну із ключових ролей у водному гомеостазі клітин. Дослідження транспортування води через вакуолярну мембрану показали, що такий тип транспорту забезпечується функціонуванням спеціалізованих транспортних протеїнів-аквапоринів. Багато різних типів аквапоринів було описано для рослинних вакуоль [101]. Аквапорини родини TIP вивчено краще за інші. Відомо, що вакуолі рослин мають три головних типи TIP-аквапоринів — альфа-, дельта- та гамма-TIP. Більшість TIP-аквапоринів має чітку вакуолярну спеціалізацію [102, 103]. Альфа- та дельта-TIP локалізовані в тонопласті ПВ [102–104]. Іноді з ПВ виділяють ще один тип, де тонопласт має виключно дельта-TIP [105]. Гамма-TIP присутній у тонопласті ЛВ, що мають кисле значення рН, та у мембранах глобоїду ПВ [102–106]. Окрім вищезазначеного гамма-TIP-аквапорину тонопласт багатьох літичних вакуоль містить с-TIP-аквапорин [107]. Альфа-TIP із ПВ відповідає за дегідратацію цих вакуоль [1]. Цікавим фактом є те, що, на відміну від гамма-TIP-аквапорину, фосфорилування альфа-TIP-аквапорину значно збільшує його пропускну здатність (рис. 1, 2) [1]. Підвищення експресії ключових генів TIP-аквапоринів може сприяти поліпшенню водного балансу клітин. А різна вакуолярна спеціалізація TIP-аквапоринів робить їх перспективними об'єктами для застосування у спеціалізованому транспорті корисних сполук у різних типах вакуоль.

**Перспективи застосування мембранних транспортних систем рослинних вакуоль**



у біотехнології рослин. Вивчення фізіології і транспорту рослинних вакуоль має велике значення для розвитку біотехнології. Вакуоля має унікальні властивості — великий розмір, обмежену метаболічну активність, що робить цю клітинну органелу резервуаром, придатним для зберігання та накопичення комерційно важливих сполук. Окрім того, існування різних типів вакуоль у рослині уможливує керування та спрямування процесу накопичення певних сполук у різних органах рослини. Наприклад, коли потрібно поліпшити харчові характеристики насіння, то слід індукувати механізми і системи транспорту ПВ. З другого боку, існування незалежного від апарату Гольджі механізму везикулярного транспорту для ПВ робить ці органели перспективним «біореактором» для зберігання корисних сполук без додаткових модифікацій, зокрема глікозилування. Вакуолі рослин мають великий потенціал у біофортificaції харчових продуктів. Так, збільшення накопичення у вакуолях важливих мікроелементів, зокрема  $Fe^{2+}$  чи  $Zn^{2+}$ , значно покращить якість харчування людини (рис. 3). Слід також наголосити, що вакуолі рослин мають великі перспективи для фіторемерації. Рослини здатні накопичувати та зберігати токсичні сполуки із навколишнього середовища у вакуолях. Вагоме значення рослинні вакуолі можуть мати у створенні безпечних для людського організму продуктів харчування. Зокрема, вибіркоче накопи-

чення токсичних чи небажаних сполук в окремих органах рослин, що не вживаються у їжу (рис. 3). Дослідження останніх років показують, що модифікація чи зміна транспорту через мембрану вакуоль може збільшувати соле- та посухостійкість рослин. Було встановлено, що підсилення експресії вакуолярної пірофосфатази чи  $Na^+/H^+$ -антипортерів сприяє зростанню толерантності рослин до засолення та посухи [53, 108]. Для поліпшення фіторемерації та біофортificaції продуктів харчування було модифіковано роботу декількох транспортних протеїнів мембрани вакуолі (рис. 3) [109, 110]. Накопичення антоціанів та флавоноїдів у вакуолях є перспективним напрямом поліпшення харчових продуктів, оскільки ці сполуки мають антиоксидантні властивості і є важливими для здоров'я людини. На жаль, на сьогодні механізм транспорту флавоноїдів та антоціанів у вакуолі залишається невідомим. Слід також зазначити, що біосинтез і накопичення важливих вторинних метаболітів у вакуолях є вкрай складним завданням і потребує розуміння механізмів не тільки вакуолярного транспорту, але й метаболічних шляхів цих сполук.

Таким чином, вивчення механізмів вакуолярного транспорту, відкриття нових типів транспортних протеїнів має велике наукове та практичне значення. Багато транспортних протеїнів тонопласта вакуолі ще очікують на своє відкриття.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Neuhaus J. M., Martinoia E. Plant Vacuoles // eLS. — 2011. — DOI: 10.1002/9780470015902.a0001675.pub2.
2. Isayenkov S., Isner J. C., Maathuis F. J. M. Vacuolar ion channels: Roles in plant nutrition and signaling // FEBS Lett. — 2010. — V. 584. — P. 1982–1988.
3. Marty F. Plant vacuoles // Plant Cell. — 1999. — V. 11. — P. 587–600.
4. Maeshima M. Tonoplast transporters: Organization and function // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 2001. — V. 52. — P. 469–497.
5. Sze H., Li X., Palmgren M. G. Energization of plant cell membranes by  $H^+$ -pumping ATPases: regulation and biosynthesis // Plant Cell. — 1999. — V. 11. — P. 677–689.
6. Martinoia E., Massonnet A., Frangne N. Transport processes of solutes across the vacuolar membrane of higher plants // Plant Cell Physiol. — 2000. — V. 41. — P. 1175–1186.
7. Hedrich R., Barbier-Brygoo H., Felle H. H. et al. General mechanisms for solute transport across the tonoplast of plant vacuoles: a patch clamp survey of ion channels and proton pumps // Bot. Acta. — 1988. — V. 101. — P. 7–13.
8. Maeshima M. Tonoplast transporters: Organization and function // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 2001. — V. 52. — P. 469–497.
9. Jiang J., Phillips T., Hamm C. et al. The protein storage vacuole: a unique compound organelle // J. Cell Biol. — 2001. — V. 155. — P. 991–1002.
10. Barkla B. J., Pantoja O. Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 1996. — V. 47. — P. 159–184.
11. Hedrich R., Neher E. Cytoplasmic calcium regulates voltage-dependent ion channels in

- plant vacuoles // *Nature*. — 1987. — V. 329. — P. 833–836.
12. Demidchik V., Maathuis F. J. M. Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development // *New Phytol.* — 2007. — V. 175. — P. 387–404.
  13. Pantoja O., Dainty J., Blumwald E. Ion channels in vacuoles from halophytes and glyco-phytes // *FEBS Lett.* — 1989. — V. 255. — P. 92–96.
  14. Fernie A. R., Martinoia E. Malate. Jack of all trades or master of a few? // *Phytochemistry*. — 2009. — V. 70. — P. 828–832.
  15. Martinoia E., Maeshima M., Neuhaus H. E. Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism // *J. Exp. Bot.* — 2007. — V. 58. — P. 83–102.
  16. Jaquinod M., Villiers F., Kieffer-Jaquinod S. et al. A proteomics dissection of *Arabidopsis thaliana* vacuoles isolated from cell culture // *Mol. Cell. Proteomics*. — 2007. — V. 6. — P. 394–412.
  17. Hafke J. B., Hafke Y., Smith J. A. et al. Vacuolar malate uptake is mediated by an anion-selective inward rectifier // *Plant J.* — 2003. — V. 35. — P. 116–128.
  18. Kovermann P., Meyer S., Hoertensteiner S. et al. The *Arabidopsis* vacuolar malate channel is a member of the ALMT family // *Ibid.* — 2007. — V. 52. — P. 1169–1180.
  19. Liu J., Magalhaes J. V., Shaff J., Kochian L. V. Aluminium-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer *Arabidopsis* aluminium tolerance // *Ibid.* — 2009. — V. 57. — P. 389–399.
  20. Harada H., Kuromori T., Hirayama T. et al. Quantitative trait loci analysis of nitrate storage in *Arabidopsis* leading to an investigation of the contribution of the anion channel gene, *AtCLCc*, to variation in nitrate levels // *J. Exp. Bot.* — 2004. — V. 405. — P. 2005–2014.
  21. De Angeli A., Monachello D., Ephritikhine G. et al. The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles // *Nature*. — 2006. — V. 442. — P. 939–942.
  22. Zifarelli G., Pusch M. Conversion of the 2Cl<sup>-</sup>/1H<sup>+</sup> antiporter ClC-5 in a NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/H<sup>+</sup> antiporter by a single point mutation // *EMBO J.* — 2009. — V. 28. — P. 175–182.
  23. Nakamura A., Fukuda A., Sakai S., Tanaka Y. Molecular cloning, functional expression and subcellular localization of two putative vacuolar voltage-gated chloride channels in rice (*Oryza sativa* L.) // *Plant Cell Physiol.* — 2006. — V. 47. — P. 32–42.
  24. Lypez-Rodriguez A., Trejo A., Coyne L. et al. The product of the gene GEF1 of *Saccharomyces cerevisiae* transports Cl<sup>-</sup> across the plasma membrane // *FEMS Yeast Res.* — 2007. — V. 8. — P. 1218–1229.
  25. Kataoka T., Watanabe-Takahashi A., Haya-shi N. et al. Vacuolar sulfate transporters are essential determinants controlling internal distribution of sulfate in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* — 2004. — V. 16. — P. 2693–2704.
  26. Gobert A., Park G., Amtmann A. et al. *Arabidopsis thaliana* cyclic nucleotide gated channel 3 forms a non-selective ion transporter involved in germination and cation transport // *J. Exp. Bot.* — 2006. — V. 57. — P. 791–800.
  27. Malho R. Coding information in plant cells: the multiple roles of Ca<sup>2+</sup> as a second messenger // *Plant Biol.* — 1999. — V. 1. — P. 487–494.
  28. Alexandre J., Lassalles J. P., Kado R. T. Opening of Ca<sup>2+</sup> channels in isolated red beet root vacuole membrane by inositol 1,4,5-triphosphate // *Nature*. — 1990. — V. 343. — P. 567–570.
  29. Allen G. J., Muir S. R., Sanders D. Release of Ca<sup>2+</sup> from individual plant vacuoles by both Insp3 and cyclic ADP-ribose // *Science*. — 1995. — V. 268. — P. 735–737.
  30. Allen G. J., Sanders D. Vacuolar ion channels of higher plants // *Adv. Bot. Res.* — 1997. — V. 25. — P. 217–252.
  31. Pottosin I. I., Wherrett T., Shabala S. SV channels dominate the vacuolar Ca<sup>2+</sup> release during intracellular signalling // *FEBS Lett.* — 2009. — V. 583. — P. 921–926.
  32. Ісаєнков С. В. Фізіологічні та молекулярні аспекти сольового стресу рослин // *Цитология и генетика*. — 2012. — № 46. — С. 50–71.
  33. Peiter E., Maathuis F. J. M., Mills L. N. et al. The vacuolar Ca<sup>2+</sup>-activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement // *Nature*. — 2005. — V. 434. — P. 404–408.
  34. Kurusu T., Yagala T., Miyao A. et al. Identification of a putative voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel as a key regulator of elicitor-induced hypersensitive cell death and mitogen-activated protein kinase activation in rice // *Plant J.* — 2005. — V. 42. — P. 798–809.
  35. Kadota Y., Furuichi T., Ogasawara Y. et al. Identification of putative voltage-dependent Ca<sup>2+</sup>-permeable channels involved in cryptoge-in-induced Ca<sup>2+</sup> transients and defense responses in tobacco BY-2 cells // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* — 2004. — V. 317. — P. 823–830.
  36. Furuichi T., Cunningham K. W., Muto S. A putative two pore channel AtTPC1 mediates Ca<sup>2+</sup> flux in *Arabidopsis* leaf cells // *Plant Cell Physiol.* — 2001. — V. 42. — P. 900–905.
  37. Allen G. J., Chu S. P., Schumacher K. et al. Alteration of stimulus-specific guard cell calcium oscillations and stomatal closing in *Arabidopsis det3* mutant // *Science*. — 2000. — V. 289. — P. 2338–2342.
  38. Ranf S., Wunnenberg P., Lee J. et al. Loss of the vacuolar cation channel, AtTPC1, does

- not impair  $\text{Ca}^{2+}$  signals induced by abiotic and biotic stresses // *Plant J.* — 2008. — V. 53. — P. 287–299.
39. *Beyhl D., Hurtensteiner S., Martinoia E. et al.* The *fou2* mutation in the major vacuolar cation channel TPC1 confers tolerance to inhibitory luminal calcium // *Ibid.* — 2009. — V. 58. — P. 715–723.
  40. *Demuro A., Parker I.* Imaging single-channel calcium microdomains // *Cell Calcium.* — 2006. — V. 40. — P. 413–422.
  41. *Whiteman S.A., Serazetdinova L., Jones A.M. et al.* Identification of novel proteins and phosphorylation sites in a tonoplast enriched membrane fraction of *Arabidopsis thaliana* // *Proteomics.* — 2008. — V. 8. — P. 3536–3547.
  42. *Wang Y.J., Yu J.N., Chen T. et al.* Functional analysis of a putative  $\text{Ca}^{2+}$  channel gene *TaTPC1* from wheat // *J. Exp. Bot.* — 2005. — V. 56. — P. 3051–3060.
  43. *Ward J.M., Schroeder J.I.* Calcium activated  $\text{K}^+$  channels and calcium-induced calcium release by slow vacuolar ion channels in guard cell vacuoles implicated in the control of stomatal closure // *Plant Cell.* — 1994. — V. 6. — P. 669–683.
  44. *Gobert A., Isayenkov S., Voelker C. et al.* The two-pore channel TPK1 gene encodes the vacuolar  $\text{K}^+$  conductance and plays a role in  $\text{K}^+$  homeostasis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2007. — V. 104. — P. 10726–10731.
  45. *Voelker C., Schmidt D., Mueller-Roeber B., Czempinski K.* Members of the *Arabidopsis* AtTPK/KCO family form homomeric vacuolar channels in planta // *Plant J.* — 2006. — V. 48. — P. 296–306.
  46. *Isayenkov S., Isner J. C., Maathuis F. J. M.* Membrane localisation diversity of TPK channels and their physiological role // *Plant Cell Signal. Behav.* — 2011. — V. 6. — P. 1201–1204.
  47. *Becker D., Geiger D., Dunkel M. et al.* AtTPK4, an *Arabidopsis* tandem-pore  $\text{K}^+$  channel, poised to control the pollen membrane voltage in a pH- and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent manner // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2004. — V. 101. — P. 15621–15626.
  48. *Dunkel M., Latz A., Schumacher K. et al.* Targeting of vacuolar membrane localized members of the TPK channel family // *Mol. Plant.* — 2008. — V. 1. — P. 938–949.
  49. *Latz A., Becker D., Hekman M. et al.* TPK1, a  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated *Arabidopsis* vacuole two-pore  $\text{K}^+$  channel is activated by 14-3-3 proteins // *Plant J.* — 2007. — V. 52. — P. 449–459.
  50. *Hamamoto S., Marui J., Matsuoka K. et al.* Characterization of a tobacco TPK-type  $\text{K}^+$  channel as a novel tonoplast  $\text{K}^+$  channel using yeast tonoplasts // *J. Biol. Chem.* — 2008. — V. 283. — P. 1911–1920.
  51. *Isayenkov S., Isner J. C., Maathuis F. J. M.* Rice Two-Pore  $\text{K}^+$  Channels Are Expressed in Different Types of Vacuoles // *Plant Cell.* — 2011. — V. 23. — P. 756–768.
  52. *Blumwald E.* Sodium transport and salt tolerance in plants // *Curr. Opin. Cell Biol.* — 2000. — V. 12. — P. 431–434.
  53. *Apse M. P., Aharon G. S., Snedden W. A., Blumwald E.* Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter in *Arabidopsis* // *Science.* — 1999. — V. 285. — P. 1656–1658.
  54. *Xue Z. Y., Zhi D. Y., Xue G. P. et al.* Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf  $\text{Na}^+$  // *Plant Sci.* — 2004. — V. 167. — P. 849–859.
  55. *Zhang H. X., Blumwald E.* Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit // *Nat. Biotechnol.* — 2001. — V. 19. — P. 765–768.
  56. *Li W. Y. F., Wong F. L., Tsai S. N. et al.* Tonoplast-located GmCLC1 and GmNHX1 from soybean enhance  $\text{NaCl}$  tolerance in transgenic bright yellow (BY)-2 cells // *Plant Cell Environ.* — 2006. — V. 29. — P. 1122–1137.
  57. *Fukuda A., Nakamura A., Tanaka Y.* Molecular cloning and expression of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger gene in *Oryza sativa* // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1999. — P. 149–155.
  58. *Yokoi S., Bressan R. A., Hasegawa P. M.* Salt Stress Tolerance of Plants // JIRCAS Working Report. — 2002. — P. 25–33.
  59. *Fukuda A., Nakamura A., Tagiri A. et al.* Function, intracellular localization and the importance of salt tolerance of a vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter from rice // *Plant Cell Physiol.* — 2004. — V. 45. — P. 146–159.
  60. *Chen Z. H., Pottosin I. I., Cuin T. A. et al.* Root plasma membrane transporters controlling  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  homeostasis in salt-stressed barley // *Plant Physiol.* — 2007. — V. 145. — P. 1714–1725.
  61. *Yokoi S., Quintero F. J., Cubero B. et al.* Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporters in the salt stress response // *Plant J.* — 2002. — V. 30. — P. 529–539.
  62. *Rodriguez-Rosales M. P., Jiang X., Galvez F. J. et al.* Overexpression of the tomato  $\text{K}^+/\text{H}^+$  antiporter LeNHX2 confers salt tolerance by improving potassium compartmentalization // *New Phytol.* — 2008. — V. 179. — P. 366–377.

63. Jiang X., Leidi E. O., Pardo J. M. How do vacuolar NHX exchangers function in plant salt tolerance? // *Plant Signal. Behav.* — 2010. — V. 5. — P. 792–795.
64. Hirschi K. D., Zhen R., Cunningham K. W. et al. CAX1, an H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> antiporter from *Arabidopsis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1996. — V. 93. — P. 8782–8786.
65. Shigaki T., Rees I., Nakhleh N., Hirschi K. D. Identification of three distinct phylogenetic groups of CAX cation/proton antiporters // *J. Mol. Evol.* — 2006. — V. 63. — P. 815–825.
66. Manohar M., Shigaki T., Hirschi K. D. Plant cation/H<sup>+</sup> exchangers (CAXs): biological functions and genetic manipulations // *Plant Biol.* — 2011. — V. 4. — P. 561–569.
67. Gunshin H., Mackenzie B., Berger U. V. et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter // *Nature.* — 1997. — V. 388. — P. 482–488.
68. Belouchi A., Kwan T., Gros P. Cloning and characterization of the OsNRAMP family from *Oryza sativa*, a new family of membrane proteins possibly implicated in the transport of metal ions // *Plant. Mol. Biol.* — 1997. — V. 33. — P. 1085–1092.
69. Mäser P., Thomine S., Schroeder J. I. et al. Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* — 2001. — V. 126. — P. 1646–1667.
70. Williams L. E., Pittman J. K., Hall J. L. Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2000. — V. 1465. — P. 104–126.
71. Thomine S., Wang R., Ward J. M. et al. Cadmium and iron transport by members of a plant transporter gene family in *Arabidopsis* with homology to NRAMP genes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2000. — V. 97. — P. 4991–4996.
72. Thomine S., Lelièvre F., Debarbieux E. et al. AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency // *Plant J.* — 2003. — V. 34. — P. 685–695.
73. Lanquar V., Lelièvre F., Bolte S. et al. Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron // *EMBO J.* — 2005. — V. 24. — P. 4041–4051.
74. Salt D. E., Wagner G. J. Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots — evidence for a Cd<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiport activity // *J. Biol. Chem.* — 1993. — V. 268. — P. 12297–12302.
75. Shaul O., Hilgemann D. W., De Almeida-Engler J. et al. Cloning and characterization of a novel Mg/H exchanger // *EMBO J.* — 1999. — V. 18. — P. 3973–3980.
76. Van Der Zaal B. J., Neuteboom L. W., Pinas J. E. et al. Overexpression of a novel *Arabidopsis* gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation // *Plant Physiol.* — 1999. — V. 119. — P. 1047–1055.
77. Kobae Y., Uemura T., Sato M. et al. Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis // *Plant Cell Physiol.* — 2004. — V. 45. — P. 1749–1758.
78. Morel M., Crouzet J., Gravot A. et al. AtHMA3, a P1b-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* — 2008. — V. 149. P. 894–904.
79. Brinch-Pedersen H., Borg S., Tauris B., Holm P. B. Molecular genetic approaches to increasing mineral availability and vitamin content of cereals // *J. Cereal Sci.* — 2007. — V. 46. — P. 308–326.
80. Bolte S., Lanquar V., Soler M. N. et al. Distinct lytic vacuolar compartments are embedded inside the protein storage vacuole of dry and germinating *Arabidopsis thaliana* seeds // *Plant Cell Physiol.* — 2011. — V. 52. — P. 1142–1152.
81. Garcia-Molina A., Andrrés-Coltás N., Perea-García A. et al. The intracellular *Arabidopsis* COPT5 transport protein is required for photosynthetic electron transport under severe copper deficiency // *Plant J.* — 2011. — V. 65. — P. 848–860.
82. Klaumann S., Nickolaus S. D., Furst S. H., Starck S. The tonoplast copper transporter COPT5 acts as an exporter and is required for interorgan allocation of copper in *Arabidopsis thaliana* // *New Phytol.* — 2011. — V. 92. — P. 393–404.
83. Fontes N., Gerys H., Delrot S. Grape Berry Vacuole: A Complex and Heterogeneous Membrane System Specialized in the Accumulation of Solutes // *Am. J. Enol. Vitic.* — 2011. — P. 270–278.
84. Schulz A., Beyhl D., Marten I. et al. Proton-driven sucrose symport and antiport are provided by the vacuolar transporters SUC4 and TMT1/2 // *Plant J.* — 2011. — V. 68. — P. 129–136.
85. Etxeberria E., Pozueta-Romero J., Gonzalez P. In and out of the plant storage vacuole // *Plant Sci.* — 2012. — V. 190. — P. 52–61.
86. Endler A., Meyer S., Schelbert S. et al. Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and *Arabidopsis* mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach // *Plant Physiol.* — 2006. — V. 141. — P. 196–207.
87. Reinders A., Sivitz A. B., Starker C. G. et al. Functional analysis of LjSUT4, a vacuolar

- sucrose transporter from *Lotus japonicus* // Plant Mol. Biol. — 2008. — V. 68 — P. 289–299.
88. Martinoia E., Meyer S., De Angeli A., Nagy R. Vacuolar Transporters in Their Physiological Context // Annu. Rev. Plant Biol. — 2012. — V. 63. — P. 183–213.
89. Aluri S., Buettner M. Identification and functional expression of the *Arabidopsis thaliana* vacuolar glucose transporter 1 and its role in seed germination and flowering // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2007. — V. 104. — P. 2537–2542.
90. Rea P. A., Li Z.-S., Lu Y.-P. et al. From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 1998. — V. 49. — P. 727–760.
91. Marinova K., Pourcel L., Weder B. et al. The *Arabidopsis* MATE transporter TT12 acts as a vacuolar flavonoid/H<sup>+</sup> antiporter active in proanthocyanidin-accumulating cells of the seed coat // Plant Cell. — 2007. — V. 19. — P. 2023–2038.
92. Klein M., Martinoia E., Hoffmann-Thoma G., Weissenböck G. A membrane-potential dependent ABC-like transporter mediates the vacuolar uptake of rye flavone glucuronides: regulation of glucuronide uptake by glutathione and its conjugates // Plant J. — 2000. — V. 21. — P. 289–304.
93. Liu G., Sanchez-Fernandez R., Li Z. S., Rea P. A. Enhanced multispecificity of *Arabidopsis* vacuolar multidrug resistance-associated protein-type ATP-binding cassette transporter, AtMRP2 // J. Biol. Chem. — 2001. — V. 276. — P. 8648–8656.
94. Goodman C. D., Casati P., Walbot V. A multidrug resistance-associated protein involved in anthocyanin transport in *Zea mays* // Plant Cell. — 2004. — V. 16. — P. 1812–1826.
95. Yazaki K., Shitan N., Sugiyama A., Takanashi K. Cell and molecular biology of ATP-binding cassette proteins in plants // Int. Rev. Cell Mol. Biol. — 2009. — V. 276. — P. 263–299.
96. Song W.-Y., Park J., Mendoza-Corzo D. G. et al. Arsenic tolerance in *Arabidopsis* is mediated by two ABCC-type phytochelatin transporters // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2010. — V. 107. — P. 21187–21192.
97. Shi J., Wang H., Schellin K. et al. Embryo-specific silencing of a transporter reduces phytic acid content of maize and soybean seeds // Nat. Biotechnol. — 2007. — V. 25. — P. 930–937.
98. Nagy R., Grob H., Weder B. et al. The *Arabidopsis* ATP-binding cassette protein ATMRP5/ATABCC5 is a high-affinity inositol hexakisphosphate transporter involved in guard cell signaling and phytate storage // J. Biol. Chem. — 2009. — V. 284. — P. 33614–33622.
99. Klein M., Geisler M., Suh S. J. et al. Disruption of AtMRP4, a guard cell plasma membrane ABCC-type ABC transporter, leads to deregulation of stomatal opening and increased drought susceptibility // Plant J. — 2004. — V. 39. — P. 219–236.
100. Raichaudhuri A., Peng M., Naponelli V. et al. Plant vacuolar ATP-binding cassette transporters that translocate folates and antifolates in vitro and contribute to antifolate tolerance in vivo // J. Biol. Chem. — 2009. — V. 284. — P. 8449–8460.
101. Maurel C. Plant aquaporins: novel functions and regulation properties // FEBS Lett. — 2007. — V. 581. — P. 2227–2236.
102. Paris N., Stanley C. M., Jones R. L., Rogers J. C. Plant cells contain two functionally distinct vacuolar compartments // Cell. — 1996. — V. 85. — P. 563–572.
103. Gattolin S., Sorieul M., Frigerio L. Tonoplast intrinsic proteins and vacuolar identity // Biochem. Soc. Transact. — 2010. — V. 38. — P. 769–773.
104. Frigerio L., Hinz G., Robinson D. G. Multiple vacuoles in plant cells: rule or exception? // Traffic. — 2008. — V. 9. — P. 1564–1570.
105. Park M., Kim S. J., Vitale A., Hwang I. Identification of the Protein Storage Vacuole and Protein Targeting to the Vacuole in Leaf Cells of Three Plant Species // Plant Physiol. — 2004. — V. 134. — P. 625–639.
106. Jiang J., Phillips T., Hamm C. et al. The protein storage vacuole: a unique compound organelle // J. Cell Biol. — 2001. — V. 155. — P. 991–1002.
107. Martinez D. E., Costa M. L., Gomez F. M. et al. Senescence-associated vacuoles are involved in the degradation of chloroplast proteins in tobacco leaves // Plant J. — 2008. — V. 56. — P. 196–206.
108. Gaxiola R. A., Li J., Undurraga S. et al. Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H<sup>+</sup>-pump // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2001. — V. 98. — P. 11444–11249.
109. Palmgren M. G., Clemens S., Williams L. E. et al. Zinc biofortification of cereals: problems and solutions // Trends Plant Sci. — 2010. — V. 13. — P. 464–473.
110. Singh B. R., Gupta S. K., Azaizeh H. et al. Safety of food crops on land contaminated with trace elements // J. Sci. Food Agric. — 2011. — V. 91. — P. 1349–1366.

**ТРАНСПОРТНЫЕ СИСТЕМЫ  
ТОНОПЛАСТА РАСТИТЕЛЬНЫХ  
ВАКУОЛЕЙ И ИХ ПОТЕНЦИАЛЬНОЕ  
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИИ**

*С. В. Исаенков*

Институт пищевой биотехнологии  
и геномики  
НАН Украины,  
Киев

*E-mail: stan.isayenkov@gmail.com*

В обзоре анализируется роль растительных вакуолей в жизнедеятельности растений, в частности в поддержании клеточного тургорного давления, хранении минералов и питательных веществ. Описаны главные механизмы транспорта через вакуолярную мембрану вакуоли. Приведены основные типы транспорта питательных веществ, тяжелых металлов, витаминов и органических соединений через тонопласт растительных вакуолей. Рассмотрены главные системы мембранного транспорта растительных вакуолей, их физиологические функции и даны характеристики наиболее известных транспортных протеинов вакуолей.

Обсуждаются значение и роль транспорта различных химических соединений в вакуоли для жизнедеятельности растения. Описаны главные типы растительных вакуолей и их роль в функционировании клетки. Рассматривается состояние современных исследований мембранного транспорта растительных вакуолей. Приведены примеры использования принципов и механизмов вакуолярного транспорта в различных областях биотехнологии растений. Очерчены перспективы новых направлений и подходов в развитии биотехнологии растений с применением разных типов вакуолей и систем мембранного вакуолярного транспорта.

**Ключевые слова:** вакуоль, тонопласт, мембранный транспорт, каналы, транспортеры, биотехнология.

**THE TONOPLAST TRANSPORT SYSTEMS  
OF PLANT VACUOLES AND THEIR  
POTENTIAL APPLICATION  
IN BIOTECHNOLOGY**

*S. V. Isayenkov*

Institute of Food Biotechnology  
and Genomics of National Academy  
of Sciences of Ukraine,  
Kyiv

*E-mail: stan.isayenkov@gmail.com*

The pivotal role of plant vacuoles in plant survival was discussed in the review. Particularly, the providing of cellular turgor, accumulation of inorganic osmolytes and nutrients are the primary tasks of these cellular organelles. The main mechanisms of tonoplast transport systems were described. The known transport pathways of minerals, heavy metals, vitamins and other organic compounds were classified and outlined. The main systems of membrane vacuolar transport were reviewed. The outline of the physiological functions and features of vacuolar membrane transport proteins were performed.

The physiological role of transport of minerals, nutrients and other compounds into vacuoles were discussed. This article reviews the main types of plant vacuoles and their functional role in plant cell. Current state and progress in vacuolar transport research was outlined. The examples of application for principles and mechanisms of vacuolar membrane transport in plant biotechnology were given. The perspectives and approaches in plant and food biotechnology concerning transport and physiology of vacuoles are discussed.

**Key words:** vacuole, tonoplast, membrane transport, channels, transporters, biotechnology.



## БАКТЕРІЇ РОДУ *NOCARDIA* ЯК ОБ'ЄКТИ БІОТЕХНОЛОГІЇ

Т. П. ПИРОГ, Д. І. ХОМ'ЯК, Н. А. ГРИЦЕНКО,  
А. П. СОФІЛКАНИЧ, А. Д. КОНОН, Х. А. ПОКОРА

Національний університет харчових технологій, Київ, Україна

E-mail: [tapiro@nuft.edu.ua](mailto:tapiro@nuft.edu.ua)

Отримано 26.03.2013

Наведено дані літератури та результати проведених авторами експериментів, що стосуються біотехнологічного потенціалу бактерій роду *Nocardia*. Розглянуто використання цих мікроорганізмів як деструкторів аліфатичних (октан, пентадеканол, ейкозан, октакозан, гексатриаконтан, пристан), ароматичних (фенол, октилбензен, фенатрен, антрацен), нітроароматичних (4-нітрофенол), гетероциклічних (піридин,  $\alpha$ -піколін) вуглеводнів. Показано перспективи застосування нокардій у процесах біотрансформації речовин (утворення даїдзену, ібупрофену, нікотинової кислоти) та синтезу деяких використовуваних на практиці метаболітів, зокрема антимікробних і цитотоксичних речовин (аяміцин, трансвалецин А, нокатіоцин, бразилібактин А, нокарацини та ін.), а також речовин з поверхнево-активними й емульгувальними властивостями.

Підсумовано експериментальні результати щодо оптимізації умов культивування ізольованого із забрудненого нафтою ґрунту штаму нафтоокиснювальних бактерій *Nocardia vaccinii* К-8 та інтенсифікації синтезу поверхнево-активних речовин на гліцеролі — побічному продукті виробництва біодизеля. Встановлено здатність штаму К-8 асимілювати деякі ароматичні сполуки (фенол, бензол, толуол, нафталін, гексахлорбензол, сульфанилова та N-фенілантранілова кислоти, 0,3–0,5%). Показано, що через 30 діб максимальний ступінь деструкції (94–98%) нафти (2,6 г/л) у воді спостерігався за оброблення суспензією клітин *N. vaccinii* К-8 ( $9,8 \cdot 10^7$  КУО/мл), тимчасом як для очищення забрудненого нафтою ґрунту (20 г/кг) ефективнішим виявився препарат поверхнево-активних речовин (100–300 мл/кг) у вигляді постферментаційної культуральної рідини (деструкція 74–83% нафти). Встановлено, що поверхнево-активним речовинам (0,085–0,85 мг/мл) та іншим позаклітинним метаболітам штаму К-8 притаманна антимікробна дія щодо низки фітопатогенних бактерій родів *Pseudomonas* та *Xanthomonas*, кількість яких за присутності досліджуваних речовин знижувалась на 80–100%.

**Ключові слова:** бактерії роду *Nocardia*, деградація нафтових забруднень, біотрансформація, антибіотики, поверхнево-активні речовини.

Донедавна дані літератури щодо біотехнологічного потенціалу бактерій роду *Nocardia* були нечисленними, хоча перші повідомлення про можливість їх практичного застосування датуються 50-ми роками ХХ ст. Так, у 1956 р. Webley зі співавт. описав штами *Nocardia opaca* Т 16 і *Nocardia* sp. Р 2, здатні деградувати вуглеводневі сполуки  $C_{10}$ – $C_{16}$  [1]. У 60–70-х рр. ХХ ст. встановлено здатність представників роду *Nocardia* до деструкції циклоалканів та вуглеводнів складної будови [2–5], біотрансформації етилбензену в 1-фенілетанол та ацетофенон [6], а також з'явилися перші повідомлення про синтезовані нокардіями антибіотики [7].

Біохімічні властивості представників цього роду було узагальнено у 80-х рр. мину-

лого століття в монографії [8]. При цьому нокардії розглядали в основному як збудників захворювань у людей, тварин та рослин, а також як шкідників, здатних до біоруйнування підземних комунікацій [9]. На сьогодні рід *Nocardia* налічує 91 вид і є типовим родом родини *Nocardiaceae*, до якої належать також роди *Gordonia*, *Millisia* і *Skermania*. Історію роду *Nocardia* докладно описано в роботі Yassin зі співавт. [10].

В останнє десятиліття з'явилась інформація стосовно синтезу представниками роду *Nocardia* антибіотиків, поверхнево-активних речовин (ПАР), про їхню здатність до деградації недоступних для більшості мікроорганізмів забрудників довкілля, зокрема таких, як поліциклічні ароматичні

вуглеводні, та можливість здійснення процесів біотрансформації [11–40]. В огляді підсумовано сучасні дані про використання бактерій роду *Nocardia* та їх метаболітів у біотехнології.

### Використання представників роду *Nocardia* для деградації нафтових забруднень

Нафта являє собою комплекс різних вуглеводнів (аліфатичних, аlicиклічних, ароматичних) та інших сполук гетероциклічної і металоорганічної природи [5, 22]. Процеси видобутку, транспортування, перероблення нафти постійно супроводжуються аварійними викидами сировини у навколишнє середовище. На сьогодні вона є основним забруднювачем довкілля. Біоремедіація належить до пріоритетних методів очищення довкілля від забруднення нафтопродуктами. До потенційних переваг штамів роду *Nocardia* у деградації нафтових забруднень можна віднести: широкі катаболічні можливості, високу стійкість до несприятливих чинників зовнішнього середовища та здатність синтезувати ПАР [32, 41].

**Деградація аліфатичних вуглеводнів.** Нерозгалужені алкани є одним з найменш реакційноздатних класів органічних сполук. Проте, незважаючи на нерозчинність їх у воді, гідрофобність та високу частоту забруднення ними довкілля, вони є цілком придатним джерелом вуглецю для низки мікроорганізмів [42, 43]. Проблема природного забруднення нафтою також загострюється у зв'язку з наявністю у її складі розгалужених алканів. Останні є стійкішими до біодеградації, ніж лінійні алкани. Однією з причин стійкості може бути ускладнене споживання цих сполук у зв'язку з тим, що через розгалуженість вуглецевого ланцюга їм складно потрапити до клітини. Іншою причиною є те, що ці сполуки погано піддаються  $\beta$ -окисненню [12, 30].

Досліджено здатність мікроорганізмів, ізольованих із забрудненого внаслідок аварійного розливу нафти піщаного узбережжя Середземного моря, до деградації вуглеводнів нафти [32]. У складі мікробного угруповання ідентифіковано п'ять видів, з яких один — представник роду *Nocardia*, два — *Rhodococcus* і ще два — *Gordonia*. Встановлено, що штам *Nocardia* sp. SoB асимілював дизельне паливо, лінійні алкани ( $C_{12}$ – $C_{16}$ ), *n*-октан, октан, пентадеканол, проте не ароматичні сполуки, що можна пояснити відсутністю необхідних ензиматичних систем.

Ступінь деградації ейкозана ( $C_{20}$ ), октакозана ( $C_{28}$ ) та гексатриаконтану ( $C_{36}$ ), початкова концентрація яких становила 1 г/л, досягла 95–98% на 28-му добу за умов культивування в рідкому живильному середовищі [32]. У подальших дослідженнях встановлено, що біодеградація вуглеводнів штамом SoB у ґрунті залежала від його фізико-хімічних властивостей, а максимальний ступінь деградації становив 75% на 28-му добу [14].

В інших дослідженнях виявлено високу здатність *Nocardia cyriacigeorgica* SBUG 1472, виділеного із забруднених нафтою зразків піску пустелі в Саудівській Аравії, до деградації широкого спектра вуглеводнів: *n*-алканів з довжиною ланцюга  $C_6$ – $C_{16}$ , розгалужених алканів, зокрема пристану, а також ароматичних сполук [30]. Було встановлено залежність ефективності споживання *n*-алканів від довжини вуглеводневого ланцюга. Так, на  $C_{12}$ – $C_{16}$ -сполуках ріст спостерігався вже з першої доби культивування, тимчасом як для коротших гомологів ( $C_6$ – $C_{12}$ ) — з третьої. Для визначення можливого шляху споживання алканів у безклітинних екстрактах, одержаних з клітин, вирощених на тетрадекані, аналізували проміжні продукти метаболізму. Наявність тетрадеканола, тетрадеканової, додеканової і деканової кислот свідчить про функціонування в *N. cyriacigeorgica* SBUG 1472 монотермінального шляху окиснення вуглеводнів [30].

Під час дослідження росту штаму SBUG 1472 на пристані (0,01%, об'ємна частка) було встановлено, що ступінь споживання становив 90% за 8 год, а за концентрації пристану 0,5% — понад 84% за 3 тижні. Результати свідчать про можливість використання цього штаму в процесах очищення довкілля від широкого спектра вуглеводнів, у тому числі й з розгалуженими ланцюгами [30].

У складі мікробних угруповань, ізольованих із забрудненого пристаном та нафтою ґрунту, ідентифіковано штами *Nocardia corallina* та *Nocardia paraffinea*, яким були притаманні такі властивості, як стійкість до арсену (III, V) і кадмію (за концентрації клітин не менше  $4 \cdot 10^5$  КУО/г) та здатність до утилізації широкого спектра аліфатичних і ароматичних вуглеводнів. Варто зазначити, що в деяких випадках за низьких концентрацій металів спостерігали стимуляцію деградації вуглеводнів [11].

**Деградація ароматичних вуглеводнів.** До складу нафти входять ароматичні сполуки, наприклад бензен, а також поліциклічні ароматичні вуглеводні (ПАР), які є най-



більш екологічно небезпечними і надзвичайно стійкими до біодеструкції. Відомо, що представникам родини *Nocardiaceae* притаманна здатність до деструкції ароматичних вуглеводнів [12, 18, 30, 35, 40]. Актуальним на сьогодні залишається вивчення особливостей метаболізму ароматичних субстратів у клітинах деструкторів, що дасть змогу регулювати метаболічні процеси та інтенсифікувати біоремедіацію [44].

Встановлено шляхи метаболізму октилбензену (2-фенілоктану) в *N. cyriacigeorgica* SBUG 1472 за умов культивування штаму в рідкому живильному середовищі з 0,25 мл/л ароматичного субстрату [30]. Перетворення октилбензену розпочиналося з окиснення бічного ланцюга, при цьому як проміжний продукт було ідентифіковано 5-фенілгексанову кислоту, яка далі внаслідок β-окиснення перетворювалася на 3-фенілбутират.

У роботі [40] описано термофільний штам (оптимальна для росту температура 50 °C), здатний рости на поліциклічних ароматичних вуглеводнях, ідентифікований як *Nocardia* TSH1. Термофільні штами-деструктори ароматичних ксенобіотиків є перспективними для очищення води та ґрунту в регіонах зі спекотним кліматом. У ході досліджень було встановлено здатність штаму TSH1 розкладати фенатрен і антрацен (0,5 г/л) на 90 та 25% відповідно за умов культивування в рідкому живильному середовищі упродовж семи діб. Різний ступінь деструкції цих ароматичних сполук пояснюється відмінністю в їхній хімічній будові та різною розчинністю у воді.

Лінійні алкілбензени (ЛАБ) з ароматичною структурою є також небезпечними забруднювачами довкілля. Було селекціоновано штам *Nocardia amarae* MB-11, здатний використовувати ці сполуки як ростові субстрати [12]. Ступінь деградації ЛАБ з довжиною ланцюга C<sub>11</sub>–C<sub>14</sub> та C<sub>10</sub>–C<sub>13</sub> становив 70% на 96-ту год та 57% на 144-ту год культивування штаму MB-11 відповідно [12].

У роботі [35] досліджено очищення фенолвмісних стічних вод у тарілчастому біореакторі іммобілізованими на скляних часточках клітинами *Nocardia hydrocarbonoxydans* NCIM 2386. Слід зазначити, що іммобілізовані клітини виявили стійкість до вищих концентрацій фенолу (100 мг/л) порівняно із суспензійною культурою, для якої така концентрація була токсичною. Зниження кількості фенолу в стічних водах у результаті його асиміляції іммобілізованими клітинами штаму NCIM 2386 показано на рис. 1 [35].

У забруднених екосистемах часто наявні нітроароматичні сполуки — органічні речовини, що містять щонайменше одну нітрогрупу, приєднану до ароматичного кільця (нітробензен, 3-нітронафтален, 3-нітробіфеніл, а також різноманітні нітрополіароматичні вуглеводні). На сьогодні відомо, що в клітинах мікроорганізмів-деструкторів на першому етапі катаболізму нітроароматичних сполук відбувається відновлення нітрогрупи, після чого вони перетворюються на відповідні феноли, хінони або катехоли, з яких у подальшому утворюються інтермедіати циклу трикарбонових кислот (ЦТК) [44].

Встановлено, що штам *Nocardia* sp. TW2 здатен рости на 4-нітрофенолі та здійснювати його перетворення за двома шляхами: 1,2,4-тригідроксibenзоловим або гідрохіноновим [18].

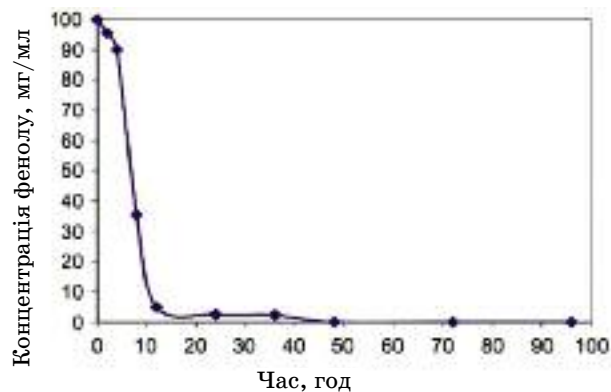


Рис. 1. Біодеградація фенолу іммобілізованими клітинами *N. hydrocarbonoxydans* NCIM 2386 [35]

У результаті функціонування першого шляху 4-нітрофенол окиснюється через 4-нітрокатехол до 1,2,4-тригідроксibenзолу. Про функціонування у клітинах другого шляху свідчить пряме окиснення 4-нітрофенолу за участю монооксигеназ до бензохінону, який згодом відновлюється до гідрохінону. Далі, незалежно від шляху катаболізму 4-нітрофенолу, відбувається розрив ароматичного кільця, після чого як 1,2,4-тригідроксibenзол, так і гідрохінон перетворюються на маліацетат, який відновлюється до β-кетoadипіну — попередника інтермедіатів ЦТК.

**Деградація гетероциклічних сполук.** Поряд з аліфатичними й ароматичними вуглеводнями безпеку для довкілля становлять також гетероциклічні сполуки, зокрема піридин та його похідні. Ці сполуки є стійкими до біодеструкції та добре розчинними у воді, тому часто ідентифікуються в забруд-

нених екосистемах, особливо у ґрунтових водах [45, 46].

У роботі [31] показано здатність штаму *Nocardia* sp. до росту на середовищі з піридином та  $\alpha$ -піколіном (0,05–0,2 мг/л). Тривалість подвоєння біомаси *Nocardia* sp. за умов культивування на піридині й  $\alpha$ -піколіні становила 8,25–16,9 та 6,9–9,05 діб відповідно. У процесі біодеградації піридину азот, що міститься у гетероциклі, перетворюється на аміак. За збільшенням концентрації амонійного азоту оцінювали ефективність споживання піридину. Згідно з теоретичними розрахунками було встановлено, що за умови 98% -ї деструкції піридину (200 мг/л) має утворитися 35,08 мг/л амонійного азоту. Проте експериментально показано, що за умов росту *Nocardia* sp. на піридині утворювалося 22 мг/л аміаку, що свідчить про деструкцію 61,5% субстрату.

Узагальнену інформацію стосовно біодеструктивного потенціалу деяких представників роду *Nocardia* наведено в табл. 1.

#### Біосинтез використовуваних на практиці метаболітів

У сучасній літературі бактерії роду *Nocardia* розглядають як продуценти ПАР [47], речовин з антимікробною активністю та здатністю до пригнічення розвитку клітин злужкисних пухлин [15–17, 19–21, 22–24, 26–29, 33, 36, 37, 39]. Окрім того, клітини нокардій, а також їхні ензиматичні системи можуть бути використані для

проведення реакцій біотрансформації [13, 25, 34, 38].

**Використання представників роду *Nocardia* у процесах біотрансформації.** У роботі [13] показано можливість застосування цитохрому P 154, виділеного з *Nocardia farcinica* IFM10152, для здійснення трансформації ізофлавоноїду формонетину (100 мкМ) у частіше застосовувані продукти — даїдзен (естрогенподібна сполука з протипухлинною активністю) та 3',4',7-тригідроксіізофлавіон (антиоксидант) (рис. 2). Встановлено, що ефективність перетворення формонетину на даїдзен та 3',4',7-тригідроксіізофлавіон становить 2,09% та 3,62% відповідно.

Уперше показано, що клітини *Nocardia corallina* В-276 можуть бути використані у процесі дерацемізації ібупрофену [25]. Клітини штаму В-276 у фосфатному буфері (0,1 М, рН 7,0) ефективно гідролізували ібупрофену нітрил до ібупрофену аміду, який далі перетворювався на ібупрофен з ефективністю 99%. У роботі [38] описано ензим *cis*-епоксисукцинатгідролазу (КФ 3.3.2.3) бактерій *Nocardia tartaricans*, що бере участь у трансформації *cis*-епоксисукцинату в L(+)-тартарову кислоту. *Nocardia globerula* NHB-2 розглядають як продуцент нікотинової кислоти, яка утворюється з 3-ціанопіридину за участю високоактивної нітрилази (ензим нітриламіногідролаза, КФ 3.5.5.1, 6,67 од/мг АСБ, 18,7 од/мл). Показано, що з додаванням досліджуваного ензиму (10 од/мл) відбувалася повна трансформація 300 мМ 3-ціанопіридину в нікотинову кислоту упродовж 1 год [34].

Таблиця 1. Деградація ксенобіотиків вуглеводневої природи мікроорганізмами роду *Nocardia*

Штам	Сполука, що піддається деградації	Початкова концентрація, г/л	Спосіб культивування	Тривалість, год	Ефективність, %	Література
<i>Nocardia</i> TSH1	Фенатрен Антрацен	0,5 0,5	У колбах на качалці	168 168	90 25	[40]
<i>Nocardia</i> sp.	Піридин $\alpha$ -Піколін	0,1 0,1	У колбах на качалці	168 168	61,5 53	[31]
<i>Nocardia</i> sp. SoB	Ейкозан (C <sub>20</sub> ) Октакозан (C <sub>28</sub> ) Гексатриаконтан (C <sub>36</sub> )	1 1 1	У пробірках з рідким середовищем	672 672 672	98,9 99,0 95,2	[32]
<i>N. cyriacigeorgica</i> SBUG 1472	Пристан	0,1 5	У колбах на качалці	8 504	90 84	[30]
<i>N. amarae</i> MB-11	Лінійні алкілбензени C11–C14 C10–C13	10 10	У колбах на качалці	96 144	70 57	[12]
<i>N. hydrocarbonoxydans</i> NCIM 2386	Фенол	0,1	Імобілізовані клітини	48	99,9	[35]
<i>Nocardia opaca</i> T 16	Фенілалкани	0,1	У колбах на качалці	40	67	[1]

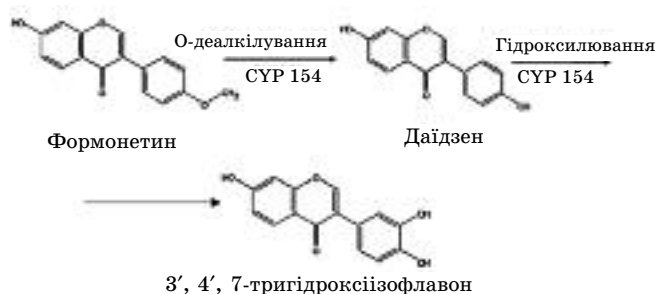


Рис. 2. Схема трансформації формонетину цитохромом P 154, виділеним з *N. farcinica* IFM10152 [13]

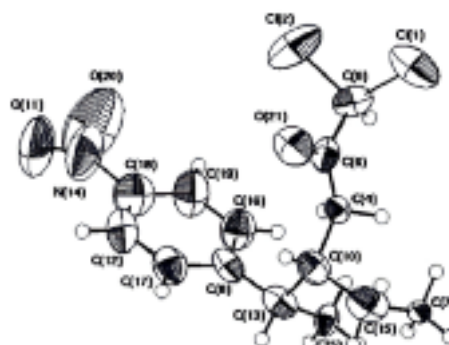


Рис. 3. Кристалічна будова аяміцину [15]

Представники роду *Nocardia* як продуценти антимікробних та цитотоксичних речовин. Однією з глобальних проблем сьогодення є виникнення мультирезистентних форм патогенних мікроорганізмів, стійких до більшості використовуваних на практиці антибіотичних речовин. Актуальним є пошук сучасних ефективних антимікробних сполук, зокрема синтезованих рідкісними та патогенними представниками актиноміцетів [48]. Так, велику кількість метаболітів з антибіотичними властивостями було виявлено у представників роду *Nocardia* [28].

У роботі [22] описано штам *Nocardia levis* МК-VL 113, що синтезував біс-(2-етилгексил)-фталат та біс-(5-етилгептил)-фталат. Цим сполукам була притаманна антимікробна дія щодо низки бактерій, дріжджів та грибів, причому більшу активність виявляв біс-(2-етилгексил)-фталат. Найчутливішими до дії цих метаболітів були *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermis* — серед бактерій, *Candida albicans*, *Epidermophyton floccosum* — серед дріжджів та *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* — серед мікроміцетів. Мінімальні інгібуючі концентрації (МІК) біс-(2-етилгексил)-фталату при цьому становили 30–50, 40–50, 50–70 мкг/мл, відповідно. Хоча є досить багато даних про біосинтез біс-(2-етилгексил)-фталату мікроорганізмами, для роду *Nocardia* здатність синтезувати цю сполуку було показано вперше, як і здатність мікроорганізмів продукувати біс-(5-етилгептил)-фталат [22].

У роботі [15] повідомляється про синтез штамом *Nocardia* sp. ALAA 2000 хризофанолу 8-метилового ефіру, асфоделін-4,7-біхризофанолу, юстицидину B та нової біологічно активної сполуки аяміцину (1,1-дихлор-4-етил-5-(4-нітрофеніл)-гексан-2-он), особливість структури якої полягає в наявності одночасно як дихлор-, так і нітрогруп (рис. 3).

Було проведено масштабування процесу культивування штаму ALAA 2000 на біотехнологічне обладнання. Утворення метаболітів починалося на 3-тю добу культивування і досягало максимуму на 7-му. Синтезованому *Nocardia* sp. ALAA 2000 аяміцину (0,1–0,5 мг/мл) була притаманна антимікробна активність щодо широкого спектра мікроорганізмів (*Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Bacillus cereus* ATCC 9634, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607, *Corynebacterium xerosis* NRRL B-1397, *Rhodotorula acuta*, *Pichia angusta*, *Candida albicans*) [15].

Патогенний для людини мікроорганізм *Nocardia brasiliensis* [16, 21, 36, 37] утворює велику групу речовин з антимікробними властивостями. Так, бразилібактин А є найвідомішим антибіотиком, що синтезується *N. brasiliensis* IFM 0995; за хімічною будовою це — індоліний алкалоїд [37]. Встановлено антимікробну активність бразилібактину А щодо *Micrococcus luteus* та *Staphylococcus aureus* (МІК 0,73 і 4,5 мг/мл, відповідно), потенційну цитотоксичність щодо клітин лейкозу мишей L1210 та раку шкіри людей KB (загибель 50% клітин за концентрації (СД<sub>50</sub>) 0,02 і 0,04 мкг/мл), а також здатність посилювати каспазну активність (0,3–3 мкМ) в клітинах лінії HL60.

Описано штам *N. brasiliensis* IFM 0667 — продуцент нокарацинів А, В, С та бразиліхінону D [36]. Показано, що компоненти А, В та D пригнічували розвиток грампозитивних бактерій, зокрема кислотостійких *Nocardia asteroides* (МІК 3,13, 1,56 і 1,56 мкг/мл відповідно), *Gordonia bronchialis* (МІК 0,39, 0,78 і 0,78 мкг/мл відповідно) та *Mycobacterium smegmatis* (МІК 6,25, 6,25 і 12,5 мкг/мл відповідно). Нокарацинам А, В, С була притаманна цитотоксична дія *in vitro* щодо клітин промієлоцитарного лейкозу



людини HL-60 (СД<sub>50</sub> 0,91, 0,51 і 0,60 мкг/мл відповідно), а бразиліхінону D — щодо клітин лейкозу мишей L1210 (СД<sub>50</sub> 11 мкг/мл) та раку шкіри людей (СД<sub>50</sub> 20 мкг/мл) [36].

У роботі [29] досліджено тіопептидний антибіотик нокардитіацин, синтезований штамом *Nocardia pseudobrasiliensis* IFM 0757, що був високоефективним проти рифампіцинрезистентних штамів *Mycobacterium tuberculosis* у концентрації 0,025–1,56 мкг/мл.

*Leet* зі спіавт. [23] описали тіазолілпептидні антибіотики нокатіацини I–III та дослідили їхню антимікробну активність щодо грампозитивних бактерій *in vitro* та *in vivo*. Нокатіацини I–III ефективно діяли на представників родів *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* та *Moraxella*, у тому числі й на мультирезистентні патогенні штами *Staphylococcus aureus* (МІК 0,003–0,007 мкг/мл), *Enterococcus faecium* (0,015–0,03 мкг/мл), *Streptococcus pneumoniae* (0,0005–0,002 мкг/мл). Показано ефективність цих антибіотиків у організмі мишей щодо *Staphylococcus aureus* [24].

У роботі [16] встановлено антимікробну активність супернатанта культуральної рідини *N. brasiliensis* щодо патогенних для риб мікроорганізмів *Vibrio damsela*. Методом дифузії в агар встановлено, що максимальний діаметр зони затримки росту тест-культури був 17 мм за додавання 50 мкл супернатанту.

Досліджено антибіотик феназин, синтезований штамом *Nocardia dassonvillei* VM-17, виділеним з Північно-Льодовитого океану. Встановлено, що цій сполуці притаманна сильна антифунгальна активність щодо *Candida albicans* (МІК 64 мкг/мл), а також цитотоксичність щодо онкологічно трансформованих клітин HepG2, A549, HCT-116 та СОС1 [17]. *Nocardia* sp., також виділені зі зразків морської води, були здатні до синтезу п'яти нових ліпопептидів, названих пептидоліпінами В–F [39]. Компоненти В та Е чинили помірну антибактеріальну дію щодо метицилінрезистентного та метицилінчутливого штамів *Staphylococcus aureus*. Сильна антимікробна активність щодо метицилінрезистентного стафілокока притаманна також антибіотику наргеніцину А<sub>1</sub>, синтезованому *Nocardia* sp. CS682 [26, 27]. Окрім того, цей антибіотик за присутності 1,25-дигідроксивітаміну D<sub>3</sub> або ретинолової кислоти пригнічував проліферацію та стимулював диференціацію клітин лейкозу HL-60 [33].

У роботі [20] описано антибіотик трансваленцин А, що є комплексом цинку з органічною кислотою, яка містить фенол як

замісник, та синтезується патогенним штамом *Nocardia transvalensis* IFM 10065. Трансваленцин А виявляв антимікробну дію щодо грибів *Trichophyton mentagrophytes* IFM 10489, *Paecilomyces variotii* IFM 40913 і *Cryptococcus neoformans* ATCC 92112 (МІК 16,0, 2,0 та 4,0 мкг/мл відповідно) і бактерій *Micrococcus luteus* IFM 2066 (МІК 16,0 мкг/мл) [19].

Узагальнену інформацію щодо здатності представників роду *Nocardia* синтезувати антибіотичні речовини наведено в табл. 2.

## Біосинтез ПАР

Окрім антибіотиків, представники роду *Nocardia* є продуцентами ПАР, однак у літературі дані про їх синтез обмежені. Так, у 2000 р. з'явилося перше повідомлення про здатність *Nocardia* sp. L-417 синтезувати ПАР на гідрофобних субстратах [47]. За хімічною природою ПАР штаму L-417 представлені сумішшю жирних кислот, які знижували поверхневий натяг води до 28 мН/м, виявляли високу емульгувальну активність, а значення критичної концентрації міцелутворення становило 20 мг/л. Також ПАР *Nocardia* sp. L-417 були стійкими в широкому діапазоні рН (2–12) і не втрачали своїх властивостей під час кип'ятіння упродовж 3 год.

У сучасних оглядах літератури, присвячених мікробним ПАР, є інформація про здатність бактерій роду *Nocardia* синтезувати поверхнево-активні гліколіпіди, у тому числі трегалозоміколати [49]. При цьому автори послуговуються інформацією кінця 80-х рр. ХХ ст., коли в літературі було описано штам *Nocardia erythropolis* — продуцент трегалозоміколатів. Однак дещо пізніше штам *Nocardia erythropolis* був рекласифікований як *Rhodococcus erythropolis*.

Таким чином, дослідження синтезу метаболітів представниками роду *Nocardia* та можливості їх застосування для очищення довкілля від ксенобіотиків, а також для створення альтернативних антимікробних препаратів є актуальним завданням сьогодення.

## Біотехнологічний потенціал *Nocardia vaccinii* К-8

У попередніх дослідженнях із забруднених нафтою зразків ґрунту нами було ізольовано штам нафтоокиснювальних бактерій, ідентифікований як *Nocardia vaccinii* К-8, та встановлено його здатність до асиміляції вуглеводневих субстратів (нафта,

Таблиця 2. Антибіотичні речовини, синтезовані деякими бактеріями роду *Nocardia*

Штам	Біологічно активна сполука	Антимікробна дія щодо	Література
<i>Nocardia levis</i> МК-VL 113	Біс-(2-етилгексил)фталат, біс-(5-етилгептил)фталат	<i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>C. albicans</i> , <i>E. floccosum</i> , <i>A. niger</i> , <i>F. oxysporum</i>	[22]
<i>Nocardia</i> sp. ALAA 2000	Аяміцин (1,1-дихлоро-4-етил-5-(4-нітрофеніл)-гексан-2-он)	<i>E. coli</i> ATCC 10536, <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145, <i>B. subtilis</i> ATCC 6051, <i>B. cereus</i> ATCC 9634, <i>S. aureus</i> ATCC 6538, <i>M. luteus</i> ATCC 9341, <i>M. smegmatis</i> ATCC 607, <i>C. xerosis</i> NRRL B-1397, <i>R. acuta</i> , <i>P. angusta</i> , <i>C. albicans</i>	[15]
<i>Nocardia transvalensis</i> IFM 10065	Трансвалецин А	<i>T. mentagrophytes</i> IFM 10489, <i>P. variotii</i> IFM 40913, <i>C. neoformans</i> ATCC 92112 <i>M. luteus</i> IFM 2066	[19, 20]
<i>Nocardia</i> sp. ATCC 202099	Нокатіоцин	представників родів <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> та <i>Moraxella</i> , у тому числі й мультирезистентних	[23, 24]
<i>Nocardia brasiliensis</i> IFM 0995	Бразилібактин А	<i>M. luteus</i> , <i>S. aureus</i>	[37]
<i>Nocardia brasiliensis</i> IFM 0667	Нокарацин А, В Бразиліхінон D	кислотостійких бактерій <i>N. asteroides</i> , <i>G. bronchialis</i> , <i>M. smegmatis</i>	[36]
<i>Nocardia brasiliensis</i>	Не ідентифіковано	патогену <i>V. damsela</i>	[16]
<i>Nocardia pseudobrasiliensis</i> IFM 0757	Нокардитіацин (тіопептид)	рифампіцинрезистентного штаму <i>M. tuberculosis</i>	[29]
<i>Nocardia</i> sp. CS682	Наргеніцин А1	метицилінрезистентного штаму <i>S. aureus</i>	[26, 27]
<i>Nocardia</i> sp.	Пептидоліпін В, Е (ліпопептид)	метицилінрезистентного та метицилінчутливого штамів <i>S. aureus</i>	[39]
<i>Nocardia dassonvillei</i> BM-17	Феназин	<i>C. albicans</i>	[17]

рідкі парафіни, гексадекан), причому ступінь утилізації цих гідрофобних сполук підвищувався за умов іммобілізації бактеріальних клітин [50].

На першому етапі встановлено можливість синтезу метаболітів з поверхнево-активними та емульгувальними властивостями за умов росту *N. vaccinii* К-8 на гідрофільних (глюкоза, етанол) і гідрофобних (гексадекан, рідкі парафіни) субстратах. Підібрано оптимальні умови культивування на середовищі з глюкозою та етанолом (концентрація субстратів 1%, тривалість культивування 120–168 год, наявність у середовищі іонів заліза та дріжджового автолізу), які дали змогу збільшити показники синтезу ПАР майже утричі.

Подальші дослідження були спрямовані на пошук шляхів інтенсифікації синтезу ПАР під час культивування *N. vaccinii* К-8 на гліцеролі [51, 52]. Вибір такого субстрату зумовлений тим, що на сьогодні у світі досить гостро постала проблема утилізації гліцеролу — побічного продукту, утворюваного у величезних кількостях під час виробництва біодизеля з рослинної і тваринної сировини [53–55]. Найперспективнішим

шляхом вирішення цієї проблеми вважають використання гліцеролу як ростового субстрату в біотехнологічних виробництвах практично цінних продуктів. Використання однофакторних експериментів і математичних методів планування для оптимізації складу живильного середовища (0,5 г/л  $\text{NaNO}_3$ , 0,3 г/л дріжджового екстракту і 1,5% гліцеролу) уможливило підвищення синтезу ПАР *N. vaccinii* К-8 у 4 рази [52]. За хімічним складом ПАР, синтезовані *N. vaccinii* К-8 на гліцеролі, є комплексом нейтральних, гліко- та аміноліпідів. Нейтральні ліпіди представлені міколовими кислотами та *n*-алкановими кислотами, гліколіпіди — трегалозодіацелатами та трегалозоміколатами [52].

Отже, одержані нами результати є одними з перших даних, що свідчать про здатність представників роду *Nocardia* синтезувати незвичайні за хімічним складом ПАР на гліцеролвмісному середовищі.

Виходячи з хімічної природи ПАР ми припустили, що можна підвищити ефективність процесу їх біосинтезу внесенням у середовище цитрату натрію — регулятора синтезу ліпідів і  $\text{C}_4$ -дикарбонових кислот — попередників глюконеогенезу, що функціо-

нує за вирощування бактерій на неуглеводних субстратах. Показано, що одночасне внесення в середовище з гліцеролом 0,2% фумарату і 0,2% цитрату на початку стаціонарної фази росту штаму К-8 супроводжувалося підвищенням на 40% кількості синтезованих ПАР порівняно з культивуванням бактерій на середовищі без органічних кислот [52].

Наступними дослідженнями встановлено здатність *N. vaccinii* К-8 рости на таких ароматичних сполуках (0,3–0,5%), як фенол, бензол, толуол, нафталін, гексахлорбензол, сульфанілова та N-фенілантранілова кислота. При цьому під час послідовних пересівів *N. vaccinii* К-8 на цих субстратах спостерігали не лише стабільний ріст штаму К-8, а й підвищення концентрації біомаси в середньому на 30–40% (табл. 3). У деяких випадках асиміляція сполук ароматичної природи штамом К-8 супроводжувалася синтезом ПАР. Враховуючи стабільний ріст *N. vaccinii* К-8 на зазначених субстратах, можна вважати досліджуваний штам ефективним для очищення довкілля від ксенобіотиків ароматичної природи.

### Практичне використання позаклітинних метаболітів *N. vaccinii* К-8

Серед продуктів мікробного синтезу, широко застосовуваних у різних галузях промисловості та в природоохоронних технологіях для очищення довкілля від ксенобіотиків, що вкрай актуально на тлі сучасної екологічної кризи, є мікробні ПАР, у тому числі й синтезовані представниками роду *Nocardia* [47, 49]. Однією з основних переваг мікробних ПАР перед синтетичними аналогами є їхня біодеградабельність. Разом з тим біологічна деструкція ПАР може бути суттєвою перешкодою для їх ефективного практичного використання. Наші експерименти показали, що мікроорганізми різних таксономічних груп (бактерії, гриби і дріжджі) здатні асимілювати ПАР *N. vaccinii* К-8 як єдине джерело вуглецю та енергії, а штам К-8 не спроможний використовувати власні ПАР як джерело вуглецевого живлення. Застосування як біоциду формаліну в концентрації 0,5% дає змогу подовжити до 30 діб термін зберігання ПАР *N. vaccinii* К-8 без суттєвої втрати їх поверхнево-активних властивостей.

Таблиця 3. Ріст *Nocardia vaccinii* К-8 на ароматичних сполуках

Ароматичні сполуки	Концентрація, % (об'ємна частка)	Біомаса (г/л) за умови послідовних пересівів		
		1	2	3
Фенол	0,3	0,2±0,01	0,25±0,01	0,3±0,01
	0,5	0,25±0,01	0,35±0,01	0,45±0,02
Бензол	0,3	0,18±0,01	0,2±0,01	0,2±0,01
	0,5	0,25±0,01	0,3±0,01	0,35±0,01
Толуол	0,3	0,17±0,01	0,2±0,01	0,2±0,01
	0,5	0,2±0,01	0,25±0,01	0,3±0,01
Нафталін	0,3	0,2±0,01	0,23±0,01	0,25±0,01
	0,5	0,25±0,01	0,3±0,01	0,4±0,02
N-фенілантранілова кислота	0,3	0,2±0,01	0,22±0,01	0,25±0,01
	0,5	0,25±0,01	0,25±0,01	0,3±0,01
Сульфанілова кислота	0,3	0,15±0,01	0,15±0,01	0,17±0,01
	0,5	0,16±0,01	0,18±0,01	0,2±0,01
Гексахлорбензол	0,3	0,2±0,01	0,25±0,01	0,25±0,01
	0,5	0,3±0,01	0,3±0,01	0,35±0,01

Примітка: як інокулят для послідовних пересівів використовували культуру із середини експоненційної фази росту в кількості 10% від об'єму середовища.

Показано можливість використання клітин *N. vaccinii* К-8 та їх метаболітів для очищення води, ґрунту і піску від нафти. Досить високих результатів біодеградації нафти у воді було досягнуто із застосуванням іммобілізованих клітин *N. vaccinii* К-8 на керамзиті на спеціально сконструйованій установці (рис. 4). За продуктивності 0,68 л/год ефективність установки за концентрації нафти 100 мг/л становила близько 99% і знижувалася до 90% з підвищенням концентрації нафти до 250 мг/л [50]. Установа працювала з високою продуктивністю упродовж 30 діб з періодичним внесенням діамонійсульфату в концентрації 0,01%.

Наші подальші дослідження показали можливість очищення забрудненої нафтою води (2,6 г/л) за присутності клітин *N. vaccinii* К-8. Так, через 30 діб у разі використання суспензії клітин *N. vaccinii* К-8 ( $9,8 \cdot 10^7$  КУО/мл) ступінь деструкції нафти досягав 94–98% (рис. 5).

Використання як препаратів ПАР супернатанта і нативної культуральної рідини супроводжувалося розкладанням 60–67% нафти через 30 діб.

Інтенсифікація деструкції нафти за присутності препаратів *N. vaccinii* К-8 пов'язана з активацією природної нафтоокиснювальної мікрофлори ПАР. Так, контроль природної мікрофлори води, проведений упродовж експерименту, показав збільшення загальної кількості мікроорганізмів (навіть на порядки) в усіх зразках, оброблених препаратами штаму К-8 (зокрема й суспензією клітин).

Встановлено, що ступінь очищення забрудненого ґрунту (20 г/кг ґрунту) після оброблення препаратами ПАР *N. vaccinii* К-8 у вигляді супернатанта і нативної культуральної рідини в концентрації 100–300 мл/кг ґрунту на 30-ту добу спостереження становив 55–85% (табл. 4).

Наступні експерименти показали, що нативній культуральній рідині *N. vaccinii* К-8 притаманні високі нафтовідмивальні властивості. Так, за присутності препаратів ПАР *N. vaccinii* К-8 (30 мл) відмивання піску від нафти (0,1 мл нафти/1 г піску) становило 90%.

Позаклітинні метаболіти представників роду *Nocardia* багато науковців розглядають як альтернативу синтетичним антимікроб-

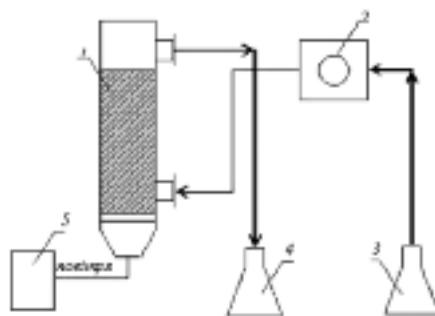


Рис. 4. Схема установки для очищення води від нафтопродуктів іммобілізованими мікроорганізмами:

1 — колонка з керамзитом; 2 — перистальтичний насос; 3 — колба із забрудненою водою; 4 — колба з очищеною водою; 5 — мікрокомпресор

Таблиця 4. Ступінь деструкції нафти у ґрунті ПАР *N. vaccinii* К-8

ПАР	Концентрація ПАР, мл/кг ґрунту	Концентрація залишкової нафти в пробі, г/кг ґрунту	Ступінь деструкції нафти, %
Культуральна рідина	100	$5,3 \pm 0,16$	$74 \pm 2,3$
	200	$5,9 \pm 0,18$	$71 \pm 2,1$
	300	$3,4 \pm 0,10$	$83,5 \pm 2,5$
Супернатант	100	$9,2 \pm 0,28$	$55 \pm 1,7$
	200	$7,9 \pm 0,24$	$61,2 \pm 1,8$
	300	$5,6 \pm 0,17$	$72,7 \pm 2,2$
Контроль	0	$20,4 \pm 0,32$	0

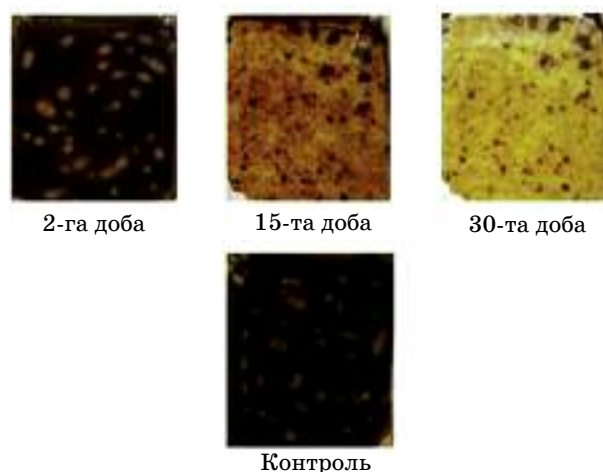


Рис. 5. Зміна структури нафтової плівки після оброблення суспензією клітин *N. vaccinii* К-8

ним препаратом [15–17, 19–21, 22–24, 26–29, 33, 36, 37, 39]. Наші експерименти показали, що за присутності ПАР *N. vaccinii* К-8 (0,085–0,85 мг/мл) кількість клітин фітопатогенних бактерій *Pectobacterium carotovorum* УКМ В-1095, *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154, *Pseudomonas syringae* УКМ В-1027, *Pseudomonas corrugate* 9070, *Pseudomonas syringae* pv. *atropfaciens* УКМ В-1015, *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* 8571, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* УКМ В-1049, *Xanthomonas vesicatoria* 7790, *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* 7696 зменшувалась на 80–98%. Слід зазначити, що не тільки ПАР штаму К-8, а й іншим позаклітинним метаболітам, що містяться у водній фазі після екстракції ПАР сумішшю метанолу і хлороформу, притаманні антимікробні властивості. Причому в цьому разі спостерігали 100%-ну загибель усіх досліджуваних фітопатогенних бактерій.

Таким чином, дані літератури і результати експериментів авторів свідчать про можливість використання бактерій роду

*Nocardia* для деструкції аліфатичних, ароматичних та гетероциклічних ксенобіотиків, таких як лінійні алкани ( $C_{12}$ – $C_{16}$ ), *n*-октан, пентадеканол, ейкозан ( $C_{20}$ ), октакозан ( $C_{28}$ ), гексатриаконтан ( $C_{36}$ ), пристан, октилбензен, фенатрен, антрацен, фенол, нітробензен, 3-нітронафтаден, 3-нітробіфеніл, 4-нітрофенол, піридин,  $\alpha$ -піколін тощо.

За допомогою клітин нокардій та їхніх ензиматичних систем можуть бути здійснені процеси біотрансформації ізофлавоноїду формонетину у даїдзен та 3',4',7-тригідроксіізофлаван, *cis*-епоксисукцинату в L(+)-тартарову кислоту, 3-ціанопіридину в нікотинову кислоту, а також дерацемізація ібупрофену.

Представники роду *Nocardia* також є продуцентами ПАР та низки сполук з антимікробною і цитотоксичною дією щодо клітин злоякісних пухлин (бразилібактин А, нокарацин А, В, С, бразиліхінон D, наргеніцин А<sub>1</sub> тощо). Отримані результати свідчать про наявність у бактерій цього роду значного біотехнологічного потенціалу, що уможливує використання їх у промисловості, екологічній та медичній галузях.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Webley D. M., Duff R. B., Farmer V. C. Evidence for  $\beta$ -oxidation in the metabolism of saturated aliphatic hydrocarbons by soil species of *Nocardia* // Nature. — 1956. — V. 178. — P. 1467–1468.
2. Розанова Е. П. Использование углеводов микроорганизмами // Успехи микробиол. — 1967. — № 4. — С. 61–96.
3. Cain R. B. The microbial metabolism of nitroaromatic compounds // J. Gen. Microbiol. — 1958. — V. 19, N 1. — P. 1–14.
4. Norris D. B., Trudgill P. W. The purification and properties of cyclohexanone oxygenase from *Nocardia globerula* CL 1 // Biochem. J. — 1972. — V. 130, N 1. — P. 30.
5. Sariaslani F. S., Harper D. B., Higgins I. J. Microbial degradation of hydrocarbons. Catabolism of 1-phenylalkanes by *Nocardia salmonicolor* // Ibid. — 1974. — V. 140, N 1. — P. 31–45.
6. Cox D. P., Goldsmith C. D. Microbial conversion of ethylbenzene to 1-phenethanol and acetophenone by *Nocardia tartaricans* ATCC 31190 // Appl. Environ. Microbiol. — 1979. — V. 38, N 3. — P. 514–520.



7. *Celmer W. D., Chmurny G. N., Moppett C. E. et al.* Structure of natural antibiotic CP-47,444 // *J. Am. Chem. Soc.* — 1980. — V. 102, N 12. — P. 4203–4209.
8. *Нестеренко О. А., Квасников Е. И., Ногунна Т. М.* Нокардиоподобные и коринеподобные бактерии. — К.: Наук. думка, 1985. — 336 с.
9. *Orchard V.* The ecology of *Nocardia* and related taxa / Actinomycetes. Stuttgart. — New York: Fisher, 1981. — P. 167–180.
10. *Yassin A. F., Straubler B., Schumann P. et al.* *Nocardia puris* sp. Nov // *Int. J. Syst. Bacteriol.* — 2003. — V. 53, N 5. — P. 1595–1599.
11. *Ali N., Dashti N., Al-Mailem D. et al.* Indigenous soil bacteria with the combined potential for hydrocarbon consumption and heavy metal resistance // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* — 2012. — V. 19, N 3. — P. 812–820.
12. *Bhatia M., Singh D. H.* Biodegradation of commercial linear alkyl benzenes by *Nocardia amarae* // *J. Biosci.* — 1996. — V. 21, N 4. — P. 487–496.
13. *Choi K.-Y., Park H.-Y., Kim B.-G.* Characterization of bi-functional CYP154 from *Nocardia farcinica* IFM10152 in the O-dealkylation and *ortho*-hydroxylation of formononetin // *Enz. Microb. Technol.* — 2010. — V. 47, N 7. — P. 327–334.
14. *De Pasquale C., Palazzolo E., Lo Piccolo L. et al.* Degradation of long-chain n-alkanes in soil microcosms by two actinobacteria // *J. Environ. Sci. Health. A. Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* — 2012. — V. 47, N 3. — P. 374–381.
15. *El-Gendy M. M. A., Hawas W. U., Jaspars M.* Novel bioactive metabolites from a marine derived bacterium *Nocardia* sp. ALAA 2000 // *J. Antibiot.* — 2008. — V. 61, N 6. — P. 379–386.
16. *El-Sersy N. A., Abou-Elela M. G.* Antagonistic effect of marine *Nocardia brasiliensis* against the pathogen *Vibrio damsela*: Application of Plackett-Burman experimental design to evaluate factors affecting the production of the antibacterial agent // *Int. J. Oceans Oceanogr.* — 2006. — V. 1, N 1. — P. 141–150.
17. *Gao X., Lu Y., Xing Y. et al.* A novel anticancer and antifungus phenazine derivative from a marine actinomycete BM-17 // *Microbiol. Res.* — 2012. — V. 167, N 10. — P. 616–622.
18. *Hanne L. F., Kirk L. L., Appel S. M. et al.* Degradation and induction specificity in actinomycetes that degrade p-nitrophenol // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1993. — V. 59, N 10. — P. 3505–3508.
19. *Hoshino Y., Mukai A., Yazawa K. et al.* Transvalencin A, a thiazolidine zinc complex antibiotic produced by a clinical isolate of *Nocardia transvalensis* I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities // *J. Antibiot. (Tokyo).* — 2004. — V. 57, N 12. — P. 797–802.
20. *Hoshino Y., Mukai A., Yazawa K. et al.* Transvalencin A, a thiazolidine zinc complex antibiotic produced by a clinical isolate of *Nocardia transvalensis* II. Structure elucidation // *Ibid (Tokyo).* — 2004. — V. 57, N 12. — P. 803–807.
21. *Imai T., Yazawa K., Tanaka Y. et al.* Productivity of antimicrobial substances in pathogenic actinomycetes *Nocardia brasiliensis* // *Microbiol. Cult. Coll.* — 1997. — V. 13. — P. 103–108.
22. *Kavitha A., Prabhakar P., Vijayalakshmi M. et al.* Production of bioactive metabolites by *Nocardia levis* MK-VL 113 // *Lett. Appl. Microbiol.* — 2009. — V. 49, N 4. — P. 484–490.
23. *Leet J. E., Li W., Ax H. A. et al.* Nocathiacins, new thiazolyl peptide antibiotics from *Nocardia* sp. II. Isolation, characterization, and structure determination // *J. Antibiot. (Tokyo).* — 2003. — V. 56, N 3. — P. 232–242.
24. *Li W., Left J. E., Ax H. A. et al.* Nocathiacins, new thiazolyl peptide antibiotics from *Nocardia* sp. I. Taxonomy, fermentation and biological activities // *Ibid (Tokyo).* — 2003. — V. 56, N 3. — P. 226–231.
25. *Lievano R., Pürez H. I., Manjarrez N. et al.* Hydrolysis of ibuprofen nitrile and ibuprofen amide and deracemisation of ibuprofen using *Nocardia corallina* B-276 // *Molecules.* — 2012. — V. 17, N 3. — P. 3148–3154.
26. *Maharjan S., Koju D., Lee H. C. et al.* Metabolic engineering of *Nocardia* sp. CS682 for enhanced production of nargenicin A<sub>1</sub> // *Appl. Biochem. Biotechnol.* — 2012. — V. 166, N 3. — P. 805–817.
27. *Maharjan S., Aryal N., Bhattarai S. et al.* Biosynthesis of the nargenicin A<sub>1</sub> pyrrole moiety from *Nocardia* sp. CS682 // *Ibid.* — 2012. — V. 93, N 2. — P. 687–696.
28. *Mikami Y.* Biological work on medically important *Nocardia* species // *Actinomyetologica.* — 2007. — V. 21. — P. 46–51.
29. *Mukai A., Fukai T., Hoshino Ya. et al.* Nocardithiocin, a novel thiopeptide antibiotic, produced by pathogenic *Nocardia pseudobrasiliensis* IFM 0757 // *J. Antibiot.* — 2009. — V. 62, N 11. — P. 613–619.
30. *Nhi-Cong L. T., Mikolasch A., Awe S. et al.* Oxidation of aliphatic, branched chain, and aromatic hydrocarbons by *Nocardia cyriacigeorgica* isolated from oil-polluted sand samples collected in the Saudi Arabian Desert // *J. Bas. Microbiol.* — 2010. — V. 50, N 3. — P. 241–253.
31. *Padoley K. V., Mudliar S. N., Pandey R. A.* Microbial degradation of pyridine and apicoline using a strain of the genera *Pseudomonas* and *Nocardia* sp. // *Bioproc. Bios. Eng.* — 2009. — V. 32, N 4. — P. 501–510.

32. *Quatrini P., Scaglione G., De Pasquale C. et al.* Isolation of Gram-positive n-alkane degraders from a hydrocarbon-contaminated Mediterranean shoreline // *J. Appl. Microbiol.* — 2008. — V. 104, N 1. — P. 251–259.
33. *Seung H. K., Yoo J. C., Kim T. S.* Nargenicin enhances 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>- and all-trans retinoic acid-induced leukemia cell differentiation via PKC $\beta$ I/MAPK pathways // *Biochem. Pharmacol.* — 2009. — V. 77, N 11. — P. 1694–1701.
34. *Sharma N. N., Sharma M., Bhalla T. C.* An improved nitrilase-mediated bioprocess for synthesis of nicotinic acid from 3-cyanopyridine with hyperinduced *Nocardia globerula* NHB-2 // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* — 2011. — V. 38, N 9. — P. 1235–1243.
35. *Shetty K. V., Verma D. K., Srinikethan G.* Modelling and simulation of steady-state phenol degradation in a pulsed plate bioreactor with immobilized cells of *Nocardia hydrocarbonoxydans* // *Bioproc. Bios. Eng.* — 2011. — V. 34, N 1. — P. 45–56.
36. *Tsuda M., Nemoto A., Komaki H. et al.* Nocarasin A-C and brasiliquinone D, new metabolites from the actinomycete *Nocardia brasiliensis* // *J. Nat. Prod.* — 1999. — V. 62, N 7. — P. 1640–1642.
37. *Tsuda M., Yamakawa M., Oka S. et al.* Brasilibactin A, a cytotoxic compound from actinomycete *Nocardia brasiliensis* // *Ibid.* — 2005. — V. 68, N 3. — P. 462–464.
38. *Vasu V., Kumaresan J., Babu M. G. et al.* Active site analysis of cis-epoxysuccinate hydrolase from *Nocardia tartaricans* using homology modeling and site-directed mutagenesis // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2012. — V. 93, N 6. — P. 2377–2386.
39. *Wyche T. P., Hou Y., Vazquez-Rivera E. et al.* Peptidolipins B-F, antibacterial lipopeptides from an ascidian-derived *Nocardia* sp. // *J. Nat. Prod.* — 2012. — V. 75, N 4. — P. 735–740.
40. *Zeinali M., Vossough M., Ardestani S. K.* Characterization of a moderate thermophilic *Nocardia* species able to grow on polycyclic aromatic hydrocarbons // *Lett. Appl. Microbiol.* — 2007. — V. 45, N 6. — P. 622–628.
41. *Chikere C. B., Chikere B. O., Okpokwasili G. C.* Bioreactor-based bioremediation of hydrocarbon-polluted Niger Delta marine sediment, Nigeria // *3 Biotech.* — 2012. — V. 2, N 1. — P. 53–66.
42. *Bouchez N. M., Rakatozafy H., Marchal R. et al.* Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake // *J. Appl. Microbiol.* — 1999. — V. 86, N 3. — P. 421–428.
43. *Coimbra C. D., Ru no R. D., Luna J. M. et al.* Studies of the cell surface properties of *Candida* species and relation to the production of biosurfactants for environmental applications // *Curr. Microbiol.* — 2009. — V. 58, N 3. — P. 245–251.
44. *Kaiser J. P., Feng Y., Bollag J. M.* Microbial metabolism of pyridine, quinoline, acridine and their derivatives under aerobic and anaerobic conditions // *Microbiol. Rev.* — 1996. — V. 60, N 3. — P. 483–498.
45. *Kaiser J. P., Feng Y., Bollag J. M.* Microbial metabolism of pyridine, quinoline, acridine and their derivatives under aerobic and anaerobic conditions // *Ibid.* — 1996. — V. 60, N 3. — P. 483–498.
46. *Rhee S. K., Lee K. Y., Chung J. C. et al.* Degradation of pyridine of *Nocardioides* sp. strain OS4 isolated from the oxic zone of a spent shale column // *Can. J. Microbiol.* — 1997. — V. 43, N 1–3. — P. 205–209.
47. *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, N 3. — P. 249–253.
48. *Hayakawa M.* Studies on the isolation and distribution of rare actinomycetes in soil // *Actinomycetologica.* — 2008. — V. 22, N 1. — P. 12–19.
49. *Banat I., Franzetti A., Gandolfi I. et al.* Microbial biosurfactants production, applications and future potential // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2010. — V. 87, N 2. — P. 427–444.
50. *Пирог Т. П., Шевчук Т. А., Волошина И. Н. и др.* Использование иммобилизованных на керамзите клеток нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки воды от нефти // *Прикл. биохим. микробиол.* — 2005. — Т. 41, № 1. — С. 58–63.
51. *Пирог Т. П., Ігнатенко С. В.* Мікробні поверхнево-активні речовини: проблеми промислового виробництва // *Біотехнологія.* — 2008. — Т. 1, № 4. — С. 29–38.
52. *Пирог Т. П., Гриценко Н. А., Хомяк Д. И. и др.* Оптимизация синтеза поверхностно-активных веществ *Nocardia vaccinii* К-8 при биоокислении отходов производства биодизеля // *Микробиол. журнал.* — 2011. — Т. 73, № 4. — С. 15–24.
53. *Ciesielski S., Pokoj T., Klimiuk E.* Cultivation-dependent and independent characterization of microbial community producing polyhydroxyalkanoates from raw glycerol // *J. Microbiol. Biotechnol.* — 2010. — V. 20, N 5. — P. 853–861.
54. *Da Silva G., Mack M., Contiero J.* Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology // *Biotechnol. Adv.* — 2009. — V. 27, N 1. — P. 30–39.
55. *Yazdani S., Gonzalez R.* Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 2007. — V. 18, N 3. — P. 213–219.

## БАКТЕРИИ РОДА *NOCARDIA* КАК ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Т. П. Пирог, Д. И. Хомяк, Н. А. Гриценко,  
А. П. Софилканич, А. Д. Конон, К. А. Погора

Национальный университет  
пищевых технологий, Киев, Украина

E-mail: tapirog@nuft.edu.ua

Приведены данные литературы и результаты осуществленных авторами экспериментов о биотехнологическом потенциале бактерий рода *Nocardia*. Рассмотрено использование этих микроорганизмов как деструкторов алифатических (октан, пентадеканол, эйкозан, октакозан, гексатриаконтан, пристан), ароматических (фенол, октилбензен, фенатрен, антрацен), нитроароматических (4-нитрофенол), гетероциклических (пиридин,  $\alpha$ -пиколин) углеводородов. Показаны перспективы использования нокардий в процессах биотрансформации веществ (образование даидзена, ибупрофена, никотиновой кислоты) и синтеза некоторых применяемых на практике метаболитов, в частности антимикробных и цитотоксических веществ (аямицин, трансваленин А, нокатионин, бразилибактин А, нокарацины и др.), а также веществ с поверхностно-активными и эмульгирующими свойствами.

Обобщены экспериментальные результаты относительно оптимизации условий культивирования изолированного из загрязненной нефтью почвы штамма нефтеокисляющих бактерий *Nocardia vaccinii* К-8 и интенсификации синтеза поверхностно-активных веществ на глицероле — побочном продукте производства биодизеля. Установлена способность штамма К-8 ассимилировать некоторые ароматические соединения (фенол, бензол, толуол, нафталин, гексахлорбензол, сульфаниловая и N-фенилантрилиловая кислоты, 0,3–0,5%). Показано, что через 30 сут максимальная степень деструкции (94–98%) нефти (2,6 г/л) в воде наблюдалась при обработке суспензией клеток *N. vaccinii* К-8 ( $9,8 \cdot 10^7$  КОЕ/мл), в то время как для очистки загрязненной нефтью почвы (20 г/кг) эффективным оказался препарат поверхностно-активных веществ (100–300 мл/кг) в виде постферментационной культуральной жидкости (деструкция 74–83% нефти). Установлено, что поверхностно-активные вещества (0,085–0,85 мг/мл) и другие внеклеточные метаболиты штамма К-8 проявляют антимикробное действие против ряда фитопатогенных бактерий родов *Pseudomonas* и *Xanthomonas*, количество которых в присутствии исследуемых препаратов снижалось на 80–100%.

**Ключевые слова:** бактерии рода *Nocardia*, деградация нефтяных загрязнений, биотрансформация, антибиотики, поверхностно-активные вещества.

## BACTERIA OF *NOCARDIA* GENUS AS OBJECT OF BIOTECHNOLOGY

T. P. Pirog, D. I. Khomyak, N. A. Grytsenko,  
A. P. Sofilkanych, A. D. Konon, K. A. Pokora

National University of Food Technologies,  
Kyiv, Ukraine

E-mail: tapirog@nuft.edu.ua

The literature and own experimental data, concerning biotechnological potential of bacteria of *Nocardia* genus are given. The use of these microorganisms as destructors of aliphatic (octane, pentadecanol, eicosane, octacosane, hexatriacontane, pristane), aromatic (phenol, octylbenzene, phenanthrene, anthracene), nitroaromatic (4-nitrophenol), heterocyclic (pyridine,  $\alpha$ -picoline) hydrocarbons is described. The prospects of use of *Nocardia* in processes of substances bio-transformation (production of daidzein, ibuprofen, nicotinic acid) and synthesis of some valuable metabolites, in particular antimicrobial and cytotoxic substances (ayamycin, transvalencin A, nocathiacin, brasilibactin A, nocaracins etc.) as well as substances with surface-active and emulsifying properties are discussed.

The own experimental data concerning optimization of cultivation conditions and intensification of surfactant synthesis on glycerol (by-product of biodiesel production) by oil oxidizing bacteria strain *Nocardia vaccinii* K-8, that was isolated from oil polluted samples of soil are presented. The ability of strain K-8 to assimilate some aromatic compounds (phenol, benzene, toluene, naphthalene, hexachlorobenzene, sulfanilic acid and N-phenylanthranilic acid, 0.3–0.5%) was determined. It was shown that the highest oil destruction degree (94–98%) in polluted water (2.6 g/L) was achieved in the case of treatment with suspension of *N. vaccinii* K-8 cells ( $9.8 \times 10^7$  CFU/mL) after 30 days, while surfactant preparation of post fermentative cultural liquid (100–300 mL/kg) was more effective for remediation (destruction of 74–83% of oil) of oil polluted soil (20 g/kg). It was determined that surfactants (0.085–0.85 mg/mL) and other exocellular metabolites of strain K-8 possess antimicrobial activity against some phytopathogen bacteria of *Pseudomonas* and *Xanthomonas* strains. In this connection the quantity of living cells decreased by 80–100% after the treatment with the investigated preparations.

**Key words:** bacteria of *Nocardia* genus, destruction of oil pollution, biotransformation, antibiotics, surfactants.

УДК 577.152.32

## **$\alpha$ -АМІЛАЗИ *Aspergillus flavus* var. *oryzae* І *Bacillus subtilis*: СУБСТРАТНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ ТА СТІЙКІСТЬ ДО НИЗКИ ХІМІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН**

К. В. Авдіюк  
Л. Д. Варбанець

Інститут мікробіології і вірусології НАН України, Київ

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

Отримано 18.03.2013

Вивчено здатність  $\alpha$ -амілаз двох продуцентів — *Aspergillus flavus* var. *oryzae* 80428 і *Bacillus subtilis* 147 розщеплювати різні вуглеводні субстрати, зокрема мальтозу, сахарозу, трегалозу, декстрин,  $\alpha$ - та  $\beta$ -циклодекстрин, амілозу, амілопектин, глікоген, пулулан, розчинний картопляний, нерозчинний картопляний, кукурудзяний, пшеничний крохмалі, декстран 500. Показано, що досліджені ензими відрізняються за субстратною специфічністю.  $\alpha$ -Амілаза *A. flavus* var. *oryzae* 80428 найефективніше гідролізує розчинний картопляний і пшеничний крохмалі, тоді як  $\alpha$ -амілаза *B. subtilis* 147 — тільки пшеничний. Ензими обох продуцентів не розщеплюють мальтозу,  $\alpha$ -циклодекстрин і декстран 500. Дуже низьку здатність до гідролізу пулулану виявлено в  $\alpha$ -амілази *A. flavus* var. *oryzae* 80428, тимчасом як  $\alpha$ -амілаза *B. subtilis* 147 взагалі не діє на нього. Найнижчі значення константи Міхаеліса для обох ензимів спостерігаються під час розщеплення глікогену, що свідчить про найвищу афінність саме до цього субстрату. Вивчення впливу хімічно активних речовин на активність досліджених ензимів показало, що  $\alpha$ -амілази *A. flavus* var. *oryzae* 80428 і *B. subtilis* 147 є стійкими до сечовини, дезоксихолевої кислоти, Твіну-80, Тритону X-100 та пероксиду водню, тобто вони є конкурентоспроможними з раніше описаними ензимами. Це уможливило у майбутньому використання цих ензимів у різних галузях промисловості, передусім у виробництві мийних засобів.

**Ключевые слова:** *Aspergillus flavus* var. *oryzae*, *Bacillus subtilis*,  $\alpha$ -амілаза, субстратна специфічність, константа Міхаеліса, хімічно активні речовини.

З розвитком біотехнології розширилися межі застосування препаратів ензимів у різних галузях промисловості. Перше місце за інтенсивністю використання серед різноманітних позаклітинних ензимів посідають  $\alpha$ -амілази (КФ 3.2.1.1, 1,4- $\alpha$ -D-глюкан-глюканогідролази) — ензими, які не впорядковано каталізують гідроліз внутрішніх  $\alpha$ -(1,4)-глікозидних зв'язків у полісахаридах, що складаються з трьох чи більше глюкозних одиниць, таких як декстрини, глікоген, крохмаль та ін. [1]. Здатність до синтезу  $\alpha$ -амілаз виявлено у мікроорганізмів, у тканинах рослин, комах та тварин [2, 3]. Однак у промисловості перевагу надають саме продуцентам мікробного походження завдяки наявності у них фізико-хімічних властивостей, важливих для промисловості, їхній широкій субстратній специфічності, високій продуктивності та легкості маніпулювання з ними. На сьогодні мікробні  $\alpha$ -амілази майже повністю витіснили хімічний

гідроліз у процесах перероблення крохмалю [2–4]. Їх широко застосовують у харчовій, спиртовій, текстильній, паперовій промисловості, пивоварінні та медицині. Так,  $\alpha$ -амілази, які активні в кислій ділянці рН, використовують у виробництві глюкозних сиропів, у лужній — як добавки до мийних засобів [2, 3, 5]. Отже, для різних галузей промисловості потрібні ензими з конкретними характеристиками специфічності, стабільності, активності за певних значень рН і температури. Тому пошук нових продуцентів  $\alpha$ -амілаз залишається актуальною галуззю досліджень.

Оскільки можливості практичного використання ензимів зумовлені їхньою здатністю гідролізувати різні субстрати, метою роботи було вивчення субстратної специфічності  $\alpha$ -амілаз двох продуцентів — *Aspergillus flavus* var. *oryzae* і *Bacillus subtilis* та дослідження стійкості їх до низки хімічно активних речовин.



## Матеріали і методи

Об'єктами дослідження були позаклітинні  $\alpha$ -амілази *A. flavus* var. *oryzae* 80428 і *B. subtilis* 147, вирощені на рідкому живильному середовищі Чапека з крохмалем такого складу (г/л):  $\text{NaNO}_3$  — 1 (*A. flavus* var. *oryzae* 80428) чи 2 (*B. subtilis* 147);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 1;  $\text{KCl}$  — 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,5;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,015; нерозчинний картопляний крохмаль — 10 (*A. flavus* var. *oryzae* 80428) чи 1 (*B. subtilis* 147); соєва мука — 10 (*B. subtilis* 147);  $\text{H}_2\text{O}$  — до 1 л; pH 6,0 [6]. Культивування мікроорганізмів на цих середовищах проводили глибинним способом в 0,75 л колбах Ерленмеєра на качалка з швидкістю обертання 220 об/хв за температури 24 °C (*A. flavus* var. *oryzae* 80428) і 42 °C (*B. subtilis* 147) протягом 5 і 3 діб, відповідно. Біомасу відділяли фільтруванням через чотири шари марлі (*A. flavus* var. *oryzae* 80428) або центрифугуванням при 5 000 г протягом 30 хв (*B. subtilis* 147). У супернатанті культуральної рідини визначали вміст протеїну й амілолітичну активність. Методи виділення й очищення  $\alpha$ -амілаз описано раніше [6]. Вони включали гель-фільтрацію на нейтральному TSK-гелі — Toyopearl HW-50 (Toyo Soda, Японія), іонообмінну хроматографію на гелі DEAE-Toyopearl 650 M (Toyo Soda, Японія) під час очищення  $\alpha$ -амілази *A. flavus* var. *oryzae* 80428, а також було використано метод афінної сорбції на крохмалі у разі  $\alpha$ -амілази *B. subtilis* 147.

Амілолітичну активність визначали ДСК-методом, що ґрунтується на виявленні вільних альдегідних груп у молекулах моно- і олігосахаридів, які при окисненні до карбоксильної групи в лужних умовах здатні відновлювати 3,5-динітросаліцилову кислоту (ДСК) до 3-аміно-5-нітросаліцилової кислоти, спричинюючи зміну жовтогарячого забарвлення на червоне. Метод з ДСК, який уперше запропонував Miller, використовували з деякими модифікаціями згідно з Кубрак [7]. Суміш для визначення активності, яка містила 0,25 мл 1%-го розчину крохмалю та 1/15 М фосфатний буфер (pH 6,0), нагрівали за температури 40 °C протягом 5 хв. Для побудови калібрувального графіка паралельно з дослідними пробами як стандарт готували 10 проб з різною кількістю 1%-го розчину перекристалізованої глюкози. У попередньо нагріті дослідні проби вносили розчин препарату ензиму в такій кількості, щоб його загальний об'єм з буфером становив 0,25 мл, та інкубували за температури 40 °C упродовж 30 хв. Після цього в усі проби додавали 0,75 мл ДСК-реагенту

(1% -й розчин 3,5-динітросаліцилової кислоти в 1% -му розчині гідроксиду натрію). Проби інкубували протягом 5 хв на киплячій водній бані (100 °C). Забарвлення утвореної 3-аміно-5-нітросаліцилової кислоти додатково стабілізували внесенням 0,25 мл 40%-го розчину калію-натрію тартрату. Проби охолоджували протягом 3 хв у льодяній бані й визначали їхню оптичну густину на СФ-26 за довжини хвилі 575 нм. Концентрацію редуруючих моносахаридів у дослідних пробах визначали за рівнянням регресії, яке відображало лінійну залежність між значеннями оптичної густини всіх точок калібрувального графіка і концентрацією глюкози (як стандарту редуруючих цукрів) у дослідних пробах. Активність  $\alpha$ -амілази обчислювали за формулою:

$$A_{\text{КТ}} = \frac{C_{\text{рц}} \cdot V_{\text{пр}}}{t \cdot V_{\text{преп}} \cdot [\text{протеїн}]}$$

де  $C_{\text{рц}}$  — концентрація редуруючих цукрів у пробах згідно з калібрувальним графіком, мкг;

$V_{\text{пр}}$  — загальний об'єм проби, мл (1,5 мл);

$t$  — час реакції гідролізу крохмалю, хв (30 хв);

$V_{\text{преп}}$  — об'єм ензимного препарату, мл;

[протеїн] — концентрація загального протеїну в ензимному препараті, мг/мл.

За одиницю активності  $\alpha$ -амілази, визначену цим методом, приймали кількість редууючих цукрів (мкг), утворених за 1 хв за даних умов. Питому активність виражали у перерахунку на 1 мг загального протеїну (Од/мг протеїну).

Субстратну специфічність  $\alpha$ -амілаз визначали, використовуючи такі субстрати: мальтозу, сахарозу, трегалозу, декстрин,  $\alpha$ - і  $\beta$ -циклодекстрин, амілозу, амілопектин, глікоген, пулулан, розчинний і нерозчинний картопляний крохмаль, пшеничний і кукурудзяний крохмаль, декстрин 500. Розчини субстратів готували в концентрації 1% з додаванням 10 мл 1/15 М фосфатного буфера (pH 6,0). Активність  $\alpha$ -амілази оцінювали ДСК-методом за стандартних умов, як зазначено вище. Відносну активність виражали у %, за 100% приймали активність  $\alpha$ -амілази під час розщеплення як субстрату розчинного картопляного крохмалю.

Кінетичні параметри  $\alpha$ -амілаз — уявну константу Міхаеліса ( $K_m$ , мг/мл) та максимальну швидкість реакції ( $V_{\text{max}}$ , мкг<sup>-1</sup>·хв·мг), визначали за графіками Лайнуївера-Берка на розчинному картопляному крохмалі, декстрині та глікогені за температури 40 °C

і рН 6,0. При цьому інкубаційне середовище в усіх експериментах містило однакову кількість  $\alpha$ -амілази *A. flavus* var. *oryzae* 80428 і *B. subtilis* 147 (3,3 Од/мг протеїну і 5,1 Од/мг протеїну, відповідно).

Вплив різних хімічно активних речовин аналізували в процесі інкубації препаратів  $\alpha$ -амілази протягом 30 хв за кімнатної температури в 1/15 М фосфатному буфері (рН 4,7 і 6,0) у присутності таких реагентів: 1) аніонних детергентів — додецилсульфату натрію в концентрації 0,001 М, 0,005 М, 0,01 М, 0,05 М, 0,1 М та дезоксихолевої кислоти в концентрації 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,5%, 1,0%; 2) неіоногенних детергентів — Тритону X-100 і Твін-80 у концентрації 0,1%, 0,5%, 1,0%, 5,0%, 10,0% (об'єм/об'єм); 3) денатуранту — сечовини в концентрації 0,005 М, 0,01 М, 0,05 М, 0,1 М, 0,5 М, 1,0 М, 2,0 М, 4,0 М, 8,0 М; в) окисника — пероксиду водню в концентрації 0,001 М, 0,005 М, 0,01 М, 0,05 М, 0,1 М, 0,5 М. Амілолітичну активність визначали йодометричним методом відповідно до ГОСТу 20264.4-89 [8].

Усі досліди проводили у 5–8 повторах. Аналіз одержаних результатів здійснювали шляхом статистичної обробки методами варіаційної і кореляційної статистики з використанням *t*-критерію Стьюдента [8]. У роботі вираховували середні значення величин і стандартні похибки ( $M \pm m$ ). Як достовірні розглядали значення  $P < 0,05$ . Результати, що подані графічно, отримували за допомогою програми Microsoft Excel 2003.

### Результати та обговорення

Важливим питанням, необхідним для розуміння можливості практичного застосування ензимів, є вивчення їхньої субстратної специфічності та кінетичних параметрів дії.

Вивчення субстратної специфічності  $\alpha$ -амілази *A. flavus* var. *oryzae* 80428 та *B. subtilis* 147 до 15 субстратів показало (рис. 1, 2), що ці ензими здатні розщеплювати всі види крохмалю, причому  $\alpha$ -амілаза *A. flavus* var. *oryzae* 80428 найефективніше розщеплює розчинний картопляний і пшеничний крохмаль, а  $\alpha$ -амілаза *B. subtilis* 147 — пшеничний крохмаль.

За ефективністю гідролізу  $\alpha$ -амілазою *A. flavus* var. *oryzae* 80428 досліджені субстрати можна розташувати у такій послідовності: розчинний картопляний крохмаль (100%) → пшеничний крохмаль (97,5%) → нерозчинний картопляний крохмаль (90%) → кукурудзяний крохмаль (85%) → амілопектин (48,5%) → глікоген (45,4%) → амілоза (43%) → декстрин (40%) →  $\beta$ -циклодекстрин

(28%) → сахароза (9%) → пулулан (3,6%). Цей ензим взагалі не гідролізує  $\alpha$ -циклодекстрин, мальтозу, трегалозу, декстран 500.

Деяко інша картина спостерігається за розщеплення вищезазначених субстратів  $\alpha$ -амілазою *B. subtilis* 147: найефективніше вона гідролізує пшеничний крохмаль (162%) → кукурудзяний крохмаль (111%) → амілозу (110%) → розчинний картопляний крохмаль (100%) → нерозчинний картопляний крохмаль, глікоген (98%) → декстрин (72%) → амілопектин (23%) → трегалозу (19%) →  $\beta$ -циклодекстрин (13%).  $\alpha$ -Амілаза *B. subtilis*

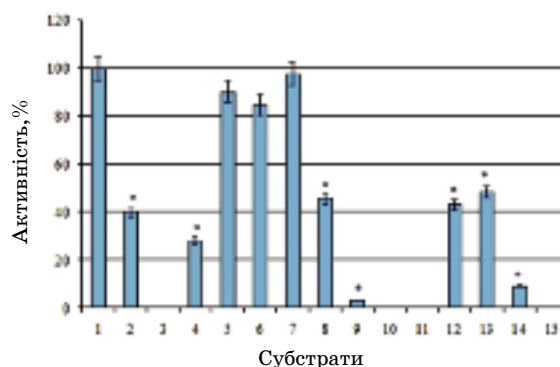


Рис. 1. Субстратна специфічність  $\alpha$ -амілази *A. flavus* var. *oryzae* 80428:

1 — розчинний картопляний крохмаль (контроль); 2 — декстрин; 3 —  $\alpha$ -циклодекстрин; 4 —  $\beta$ -циклодекстрин; 5 — нерозчинний картопляний крохмаль; 6 — кукурудзяний крохмаль; 7 — пшеничний крохмаль; 8 — глікоген; 9 — пулулан; 10 — мальтоза; 11 — трегалоза; 12 — амілоза; 13 — амілопектин; 14 — сахароза; 15 — декстран 500

\* Достовірно відмінне від контрольного значення за  $P < 0,05$

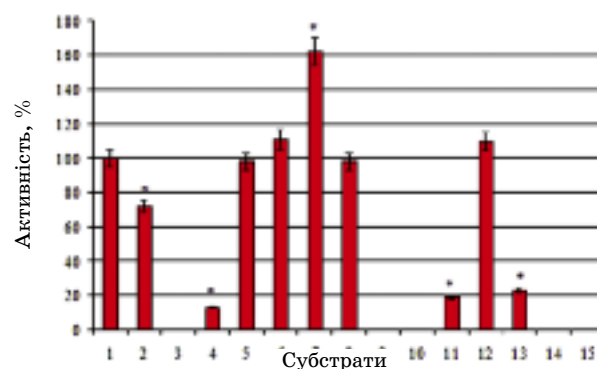


Рис. 2. Субстратна специфічність  $\alpha$ -амілази *B. subtilis* 147:

1 — розчинний картопляний крохмаль (контроль); 2 — декстрин; 3 —  $\alpha$ -циклодекстрин; 4 —  $\beta$ -циклодекстрин; 5 — нерозчинний картопляний крохмаль; 6 — кукурудзяний крохмаль; 7 — пшеничний крохмаль; 8 — глікоген; 9 — пулулан; 10 — мальтоза; 11 — трегалоза; 12 — амілоза; 13 — амілопектин; 14 — сахароза; 15 — декстран 500

\* Достовірно відмінне від контрольного значення за  $P < 0,05$

lis 147 не розщеплює  $\alpha$ -циклодекстрин, пулулан, мальтозу, декстран 500.

Аналогічні дані отримали й інші дослідники [2], які показали, що  $\alpha$ -амілаза *Penicillium citrinum* НВF62 також ефективно розщеплювала розчинний картопляний крохмаль (100%), пшеничний крохмаль (111%), кукурудзяний крохмаль (80%) та глікоген (99%), трохи гірше — амілозу (56%).  $\alpha$ -Амілаза *Geobacillus thermoleovorans* здатна активно діяти на різні види крохмалю: розчинний картопляний (100%), рисовий (98%), кукурудзяний (81%), пшеничний (87%), гірше — на амілопектин (66%) та пулулан (41%), але не здатна розщепити  $\beta$ -циклодекстрин [9].  $\alpha$ -Амілази *B. mojavensis* A21 та *B. amyloliquefaciens*, як і досліджувана нами  $\alpha$ -амілаза *B. subtilis* 147, ефективно гідролізували амілозу (117% і 120% відповідно) та картопляний крохмаль (100% і 95% відповідно) [10, 11].  $\alpha$ -Амілаза *Trichoderma harzianum*, навпаки, найкраще розщеплювала амілопектин (450%) і глікоген (274%), однак, як і досліджені нами  $\alpha$ -амілази *A. flavus* var. *oryzae* 80428 та *B. subtilis* 147, не здатна до гідролізу  $\alpha$ -циклодекстрину [12].

Отже,  $\alpha$ -амілази *A. flavus* var. *oryzae* 80428 та *B. subtilis* 147 виявляють широку субстратну специфічність, демонструючи здатність ефективно гідролізувати як розгалужені (крохмаль, глікоген, амілопектин), так і лінійні (амілоза) глюкозани. Однак  $\alpha$ -амілази обох продуцентів не здатні розщеплювати або незначною мірою розщеплюють циклічні глюкозани ( $\alpha$ - і  $\beta$ -циклодекстрин відповідно). Крім того,  $\alpha$ -амілаза *B. subtilis* 147 удвічі швидше гідролізує амілозу та глікоген, ніж  $\alpha$ -амілаза *A. flavus* var. *oryzae* 80428.

Вивчення кінетичних параметрів  $\alpha$ -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* 80428 та *B. subtilis* 147 здійснювали згідно з кінетикою Міхаеліса–Ментен [13]. Уявну константу Міхаеліса ( $K_m$ , мг/мл), яка відображає ступінь спорідненості ензиму до субстрату, та максимальну швидкість реакції ( $V_{max}$ )  $\alpha$ -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* 80428 (рис. 3–5) та *B. subtilis* 147 (рис. 6–8) визначали за графіками Лайнуївера–Берка на розчинному картопляному крохмалі, декстрині та глікогені. Вибір цих субстратів пов'язаний з їхньою здатністю розчинятись у воді.

$K_m$  і  $V_{max}$  за розщеплення розчинного картопляного крохмалю  $\alpha$ -амілазою *A. flavus* var. *oryzae* становили 4,17 мг/мл і 6,67 мкг<sup>-1</sup>·хв·мг, декстрин — 1,0 мг/мл і 2,86 мкг<sup>-1</sup>·хв·мг, глікогену — 0,43 мг/мл і 1,0 мкг<sup>-1</sup>·хв·мг, відповідно (рис. 3–5).

Схожі значення  $K_m$  під час розщеплення розчинного крохмалю спостерігали в  $\alpha$ -амілаз *Thermoactinomyces thalophilus* KSV 17 (5,20 мг/мл) [14], *Bacillus* sp. GRE1 (4,98 мг/мл) [15], *Geobacillus thermodenitrificans* (3,05 мг/мл) [16].

Вивчення кінетичних параметрів  $\alpha$ -амілази *B. subtilis* 147 показало, що  $K_m$  і  $V_{max}$  під час розщеплення нею розчинного картопляного крохмалю становили 0,40 мг/мл

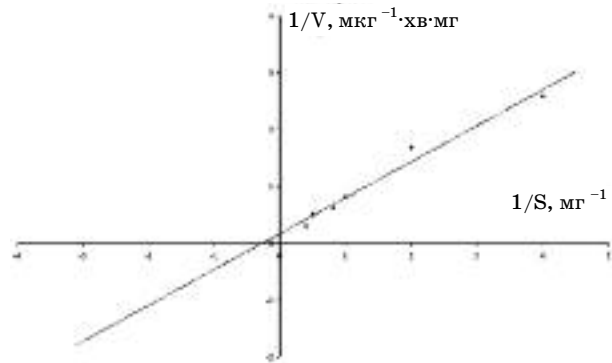


Рис. 3. Залежність оберненої швидкості гідролізу розчинного картопляного крохмалю  $\alpha$ -амілазою *A. flavus* var. *oryzae* 80428 від його оберненої концентрації

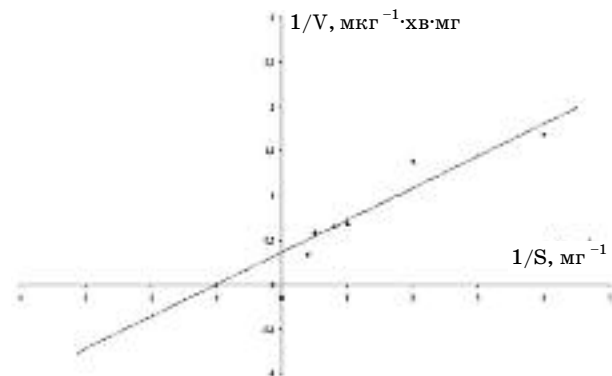


Рис. 4. Графік Лайнуївера–Берка гідролізу декстрину  $\alpha$ -амілазою *A. flavus* var. *oryzae* 80428 залежно від його концентрації

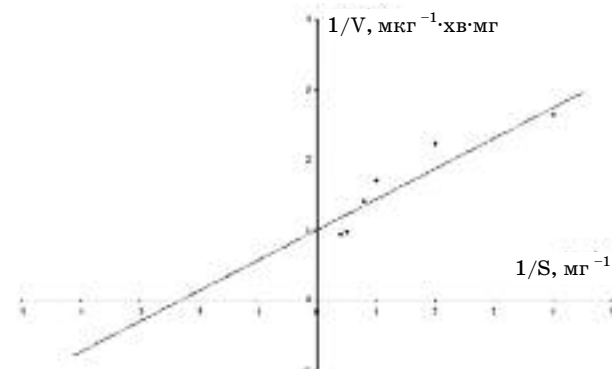


Рис. 5. Залежність оберненої швидкості гідролізу глікогену  $\alpha$ -амілазою *A. flavus* var. *oryzae* 80428 від його оберненої концентрації

і  $5,26 \text{ мкг}^{-1} \cdot \text{хв} \cdot \text{мг}$ , декстрину —  $0,63 \text{ мг/мл}$  і  $1,25 \text{ мкг}^{-1} \cdot \text{хв} \cdot \text{мг}$ , глікогену —  $0,26 \text{ мг/мл}$  і  $10,60 \text{ мкг}^{-1} \cdot \text{хв} \cdot \text{мг}$  (рис. 6–8). Подібні значення константи Міхаеліса за розщеплення розчинного крохмалю були характерними для  $\alpha$ -амілаз *Penicillium camemberti* PL21 —  $0,92 \text{ мг/мл}$  [17], *Thermobi da fusca* —  $0,88 \text{ мг/мл}$  [18], *B. subtilis* КСХ 006 —  $0,29 \text{ мг/мл}$  [19], *B. cohnii* US147 —  $0,70 \text{ мг/мл}$  [20].

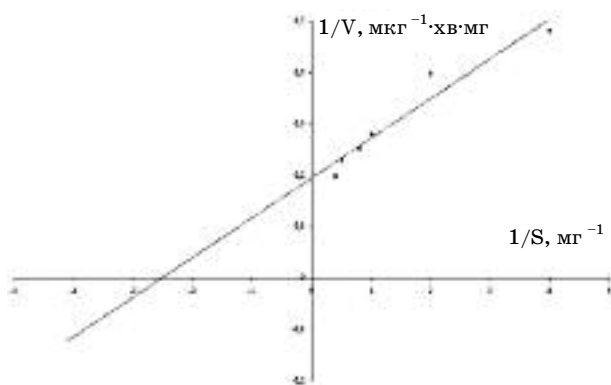


Рис. 6. Графік Лайнуївера–Берка гідролізу розчинного картопляного крохмалю  $\alpha$ -амілазою *B. subtilis* 147 залежно від його концентрації

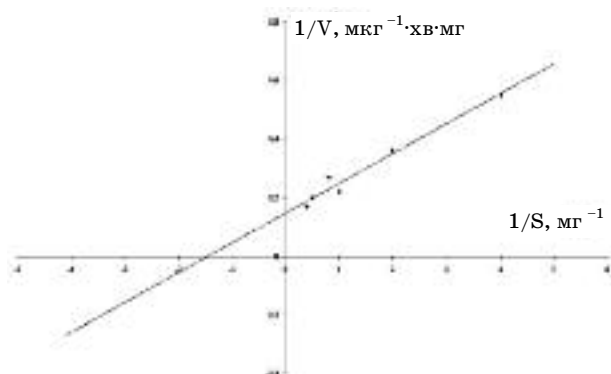


Рис. 7. Залежність оберненої швидкості гідролізу декстрину  $\alpha$ -амілазою *B. subtilis* 147 від його оберненої концентрації

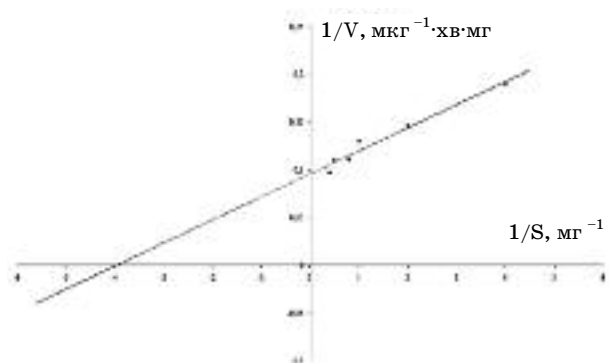


Рис. 8. Графік Лайнуївера–Берка гідролізу глікогену  $\alpha$ -амілазою *B. subtilis* 147 залежно від його концентрації

Максимальну швидкість реакції  $6,67 \text{ мкг}^{-1} \cdot \text{хв} \cdot \text{мг}$  спостерігали за розщеплення  $\alpha$ -амілазою *A. flavus* var. *oryzae* 80428 розчинного картопляного крохмалю, тимчасом як у випадку  $\alpha$ -амілази *B. subtilis* 147 максимальна швидкість реакції  $10,60 \text{ мкг}^{-1} \cdot \text{хв} \cdot \text{мг}$  відзначалася за гідролізу глікогену.

Отже, вивчення кінетичних параметрів  $\alpha$ -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* 80428 та *B. subtilis* 147 на різних субстратах показало, що обидва ензими виявляють найвищу афінність до глікогену, оскільки саме на цьому субстраті спостерігаються найнижчі значення  $K_m$ .  $\alpha$ -Амілаза *T. harzianum* також виявляла більшу спорідненість до глікогену, ніж до розчинного картопляного крохмалю, однак її  $K_m$  за розщеплення глікогену становила  $4,50 \text{ мг/мл}$ , а розчинного крохмалю —  $6,53 \text{ мг/мл}$  [12].

Деякі дослідники вважають, що різниця в значеннях  $K_m$  і  $V_{\max}$  різних ензимів зумовлена структурою субстрату та умовами реакції [21]. Крім того, на швидкість гідролізу субстратів може впливати розмір молекул субстрату, а також кількісний вміст різних типів глікозидних зв'язків:  $\alpha$ -1,4 і  $\alpha$ -1,6. Встановлено [2], що субстрати з переважним вмістом  $\alpha$ -1,4-глікозидних зв'язків розщеплюватимуться набагато швидше, ніж ті, що містять більше  $\alpha$ -1,6-глікозидних зв'язків.

Окрім субстратної специфічності, важливою властивістю  $\alpha$ -амілаз, яка визначає використання їх у різних галузях промисловості, є стійкість до агресивних речовин, таких як детергенти, сурфактанти, окисники, що часто входять до складу екологічно безпечних мийних засобів. Тому вважали за доцільне перевірити вплив деяких із них на активність  $\alpha$ -амілаз.

#### Вплив додецилсульфату натрію (ДСН) на активність $\alpha$ -амілаз

ДСН — це аніонна поверхнево-активна речовина (ПАР), що використовується у виробництві мийних засобів, шампунів, зубних паст, косметики для утворення піни, а також за електрофорезу для денатурації молекул протеїнів. Існують дані щодо здатності амінокислот протеїнів утворювати комплекси з аніонними, катіонними та неіоногенними ПАР [22]. Так, ДСН здатен утворювати асоціати з лізином [22].

За даними літератури, ДСН є активним інгібітором  $\alpha$ -амілаз, оскільки пригнічує їхню активність навіть у дуже низьких концентраціях. Так, у концентрації  $0,1\%$  ДСН спричинює зниження активності  $\alpha$ -амілази *G. thermoleovorans* на  $30\%$  [9].  $\alpha$ -Амілаза



*P. citrinum* НВF62 після 30 хв інкубування з 5 мМ ДСН зберігала 38%, а з 10 мМ — 35% активності [2].  $\alpha$ -Амілаза *B. amyloliquefaciens* виявилася чутливою до ДСН, оскільки втрачала 70% вихідної активності у присутності 5 мМ ДСН та 88% за концентрації ДСН 10 мМ [11]. Існує думка, що термостабільні ензими є резистентними до дії органічних розчинників та детергентів [9, 23]. Прикладом цього може бути  $\alpha$ -амілаза *Bacillus* sp. ВKL20, яка виявилася повністю стабільною у присутності ДСН в концентрації до 10 мМ та зберігала 64% активності у присутності 100 мМ ДСН після 30 хв інкубації [7], а  $\alpha$ -амілаза *Bacillus* sp. А3-15 після 30 хв інкубування з 1% ДСН втрачала лише 18% своєї активності [23]. Однак цьому твердженню суперечать отримані нами дані щодо майже повної втрати активності термостабільною  $\alpha$ -амілазою *B. subtilis* 147 навіть у присутності 1 мМ ДСН (рис. 9). Подібні дані було одержано в разі додавання 2–10 мМ ДСН до  $\alpha$ -амілази *B. aquimaris* VITP4, коли ензим виявився взагалі нестійким до дії ДСН [24].

Вивчення впливу ДСН на активність  $\alpha$ -амілази *A. flavus* var. *oryzae* 80428 показало, що цей ензим зберігав 69% своєї активності у присутності 1 мМ розчину даного детергенту та 19% — 5 мМ розчину після 30 хв інкубації (рис. 9).  $\alpha$ -Амілаза *P. citrinum* НВF62 після 30 хв інкубування з 1 мМ ДСН зберігала 89% активності [2],  $\alpha$ -амілаза *B. mojavensis* А21 через 1 год інкубування з 1% ДСН ( $\approx$  3 мМ) — 71% своєї активності [10],  $\alpha$ -амілаза *B. cohnii* US147 у присутності 1 мМ ДСН через 15 хв інкубування зберігала 85% вихідної активності [20], а  $\alpha$ -амілаза *Wangia* sp. С52 з додаванням 5 мМ ДСН втрачала 41% своєї активності через 10 хв інкубування [25]. Отже,  $\alpha$ -амілаза *A. flavus* var. *oryzae* 80428 є досить конкурентоздатною

щодо чутливості до ДСН порівняно з вище-описаними ензимами.

### Вплив сечовини на активність $\alpha$ -амілаз

Відомо, що більшість  $\alpha$ -амілаз є досить чутливими до дії сечовини [26].

Дослідження  $\alpha$ -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* 80428 та *B. subtilis* 147 свідчать про їхню високу стійкість до сечовини, оскільки з додаванням 8 М розчину цієї сполуки вони зберігали 86,5% та 97% своєї активності, відповідно, навіть після 30 хв інкубування (рис. 10). Крім того,  $\alpha$ -амілаза *A. flavus* var. *oryzae* 80428 виявилася повністю стабільною у присутності 5 мМ — 4 М сечовини, як і  $\alpha$ -амілаза *B. subtilis* 147 за концентрації сечовини 5 мМ. У разі додавання 10 мМ — 2 М сечовини  $\alpha$ -амілаза *B. subtilis* 147 зберігає 75–87,5% своєї активності та є повністю стійкою за додавання 4 М і 8 М денатуранту. За низьких концентрацій невеликі полярні молекули сечовини можуть вбудовуватися між пептидними ланцюгами, розриваючи водневі зв'язки, що призводить до зменшення стабільності молекули ензиму. Водночас за високих концентрацій молекули сечовини не здатні проникати в молекули ензиму, а містяться лише на її поверхні, змінюючи гідрофобність.

Більш високу стабільність  $\alpha$ -амілази *B. subtilis* 147 за високих концентрацій сечовини (від 4 до 8 М) можна пояснити тим, що невеликі полярні молекули не спроможні регулювати її здатність впливати на гідрофобність усієї молекули ензиму, тимчасом як, на відміну від досліджених нами ензимів,  $\alpha$ -амілаза *Bacillus* sp. DM-15 через 30 хв інкубування у присутності 8 М сечовини зберігала 67% своєї активності [27],  $\alpha$ -амілаза *Bacillus* sp. ВKL20 — 42% [7],  $\alpha$ -амілаза *Bacillus* sp. А3-15 — лише 20% [23], а  $\alpha$ -амілази

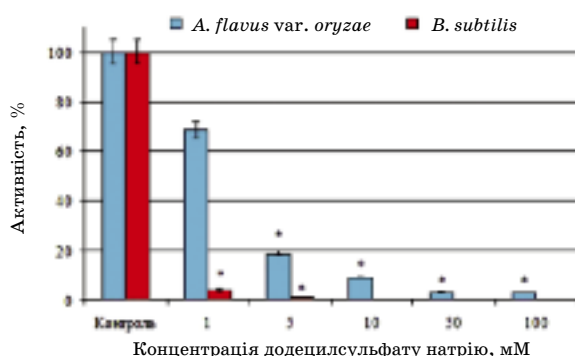


Рис. 9. Вплив додецилсульфату натрію на активність  $\alpha$ -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* 80428 та *B. subtilis* 147.

\* Достовірно відмінне від контрольного значення за  $P < 0,05$

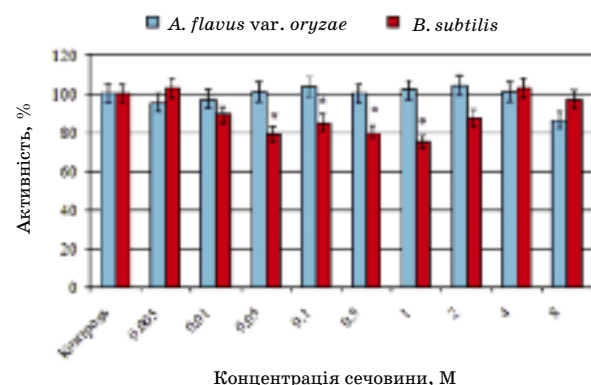


Рис. 10. Вплив сечовини на активність  $\alpha$ -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* 80428 та *B. subtilis* 147.

\* Достовірно відмінне від контрольного значення за  $P < 0,05$

з алкалофільних штамів *Bacillus* — повністю втрачали свою активність [28]. Окрім того, сечовина навіть у низькій концентрації — 5 і 10 мМ — спричинювала зниження активності  $\alpha$ -амілази *B. amyloliquefaciens* на 42% і 84%, відповідно [11], тоді як  $\alpha$ -амілаза *P. citrinum* НВF62 була повністю стійкою у присутності 1–10 мМ сечовини, яка сприяє навіть незначному (10–12%) стимулюванню активності ензиму [2].

### Вплив дезоксихолевої кислоти на активність $\alpha$ -амілаз

Вивчення впливу іншого аніонного детергенту — дезоксихолевої кислоти показало, що вона не впливала на активність  $\alpha$ -амілази *B. subtilis* 147 у концентрації 0,05%–0,5%, а підвищення її концентрації до рівня 1% зумовлювало незначне (15%) зниження активності ензиму.  $\alpha$ -Амілаза *A. flavus* var. *oryzae* 80428 повністю зберігала активність у присутності 0,05–1% дезоксихолевої кислоти після 30 хв інкубування навіть з незначним підвищенням її на 13% за концентрації поверхнево-активної речовини 0,05% і 0,1% (рис. 11). Подібні результати було отримано для  $\alpha$ -амілази *G. thermoleovorans*, у якої 1%-на холінова кислота викликала підвищення активності на 20% [9]. Одержані нами результати збігаються з даними Кубрак [7], яка показала, що  $\alpha$ -амілаза *Bacillus* sp. ВKL20 зберігала 79% активності у присутності 50 мМ дезоксихолевої кислоти та 72,5% з додаванням 100 мМ детергенту після 30 хв інкубування.

Таким чином,  $\alpha$ -амілази *A. flavus* var. *oryzae* 80428 і *B. subtilis* 147 виявилися дуже стійкими до дії дезоксихолевої кислоти.

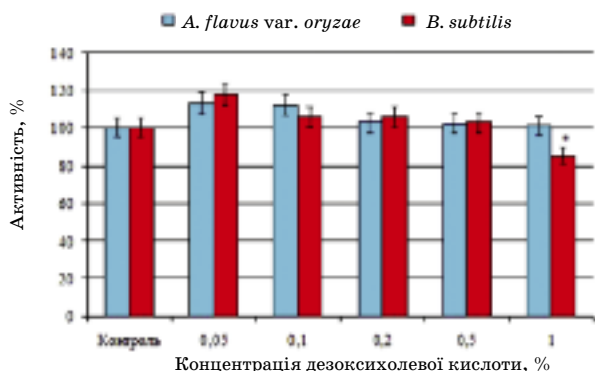


Рис. 11. Вплив дезоксихолевої кислоти на активність  $\alpha$ -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* 80428 та *B. subtilis* 147.

\* Достовірно відмінне від контрольного значення за  $P < 0,05$

### Вплив Тритону X-100 та Твіну-80 на активність $\alpha$ -амілаз

Тритон X-100 і Твін-80 належать до неіоногенних детергентів, які входять до складу деяких мийних та косметичних засобів. Відомо, що вони здатні по-різному впливати на активність одних і тих самих ензимів, виділених з подібних мікроорганізмів [29].

Вивчення впливу неіоногенних сурфактантів (об'єм/об'єм) на активність  $\alpha$ -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* 80428 та *B. subtilis* 147 показало (рис. 12, 13), що ці ензими виявляли високу стійкість до вищезазначених сполук. Тритон X-100 не справляв інгібуючого впливу на активність  $\alpha$ -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* 80428 та *B. subtilis* 147, спостерігалася навіть їх активація на 12% та 100%, відповідно, у присутності 10%-го розчину Тритону X-100 після 30 хв інкубування (рис. 12). Подібні результати були одержані Кубрак для  $\alpha$ -амілази *Bacillus* sp. ВKL20 [7], Vano та ін. [30] для  $\alpha$ -амілази *B. subtilis* KIBGE-HAS, де ступінь активації Тритоном X-100 (5%) становив 85%. Стійкою до дії цього сурфактанта була й  $\alpha$ -амілаза *A. acidocaldarius* [26]. Однак у випадку  $\alpha$ -амілази *G. thermoleovorans* спостерігалася пригнічення активності ензиму на 20% та 40%,

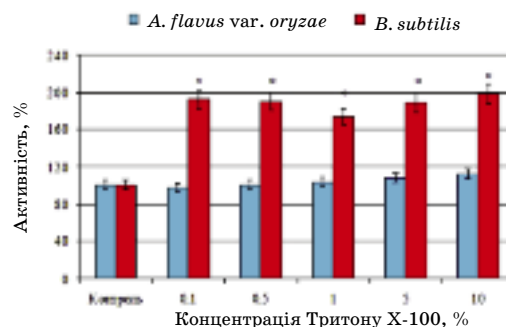


Рис. 12. Вплив Тритону X-100 на активність  $\alpha$ -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* 80428 та *B. subtilis* 147.

\* Достовірно відмінне від контрольного значення за  $P < 0,05$

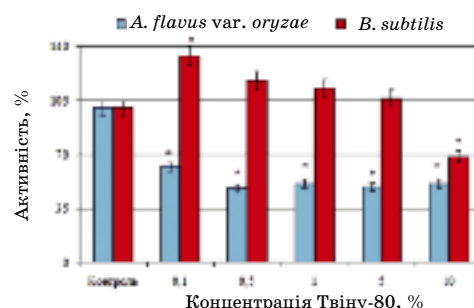


Рис. 13. Вплив Твіну-80 на активність  $\alpha$ -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* 80428 та *B. subtilis* 147.

\* Достовірно відмінне від контрольного значення за  $P < 0,05$

відповідно, у присутності 0,1% і 0,2% Тритону X-100 після 1 год інкубування [9]. Інгібуючий вплив цього детергента спостерігався і в разі  $\alpha$ -амілази *B. mojavensis* A21, активність якої знижувалася на 17% з додаванням 5% Тритону X-100 після 1 год інкубування [10].  $\alpha$ -Амілаза *Rhizobium* sp. INPA R-926 у присутності 1% - та 2% -х його розчинів зберігала 86% своєї активності [29].

Дещо інші результати одержали під впливом Твіну-80.  $\alpha$ -Амілаза *A. flavus* var. *oryzae* 80428 виявилася більш чутливою до дії цього детергента, ніж  $\alpha$ -амілаза *B. subtilis* 147, оскільки за концентрації 0,1% зберігала 60% активності, а від 0,5% до 10% Твіну-80 — лише половину активності. Водночас активність  $\alpha$ -амілази *B. subtilis* 147 підвищувалася на 6% — 34% за цієї самої концентрації детергента, і лише 10% -й Твін-80 спричинював зниження активності на 31% (рис. 13). Однак це пригнічення активності було нижчим, ніж у випадку  $\alpha$ -амілази *B. subtilis* KIBGE-HAS, яка втрачала 29% і 49% своєї активності у присутності 5% та 10% Твіну-80, відповідно [30].  $\alpha$ -Амілази *Rhizobium* sp. INPA R-926 та *Bradyrhizobium* sp. INPA R-991 також повністю зберігали свою активність у присутності 1% - та 2% -х розчинів цього детергенту, навіть спостерігалось незначне підвищення їхньої активності [29]. Як й у випадку  $\alpha$ -амілази *B. subtilis* 147, активність *G. thermoleovorans* підвищувалась у присутності 0,1% і 0,2% Твіну-80 [9].

Зниження активності  $\alpha$ -амілаз під дією Твіну-80 пов'язують з переважним вмістом у його складі олеїнової кислоти. Крім того, інгібування може бути результатом спільної дії таких чинників, як зниження гідрофобної взаємодії, що відіграє ключову роль у підтриманні третинної структури протеїну, та пряма взаємодія з його молекулою [30].

### Вплив перексиду водню на активність $\alpha$ -амілаз

Пероксид водню — дуже сильний хімічний окисник, який додають до складу мийних засобів. Тому потенційною умовою використання ензимів у процесі виготовлення екологічно безпечних мийних засобів є їхня стійкість до хімічного окиснення.

$\alpha$ -Амілази *A. flavus* var. *oryzae* 80428 та *B. subtilis* 147 є стійкими до хімічного окиснення перексидом водню (рис. 14). Так,  $\alpha$ -амілаза *A. flavus* var. *oryzae* 80428 повністю зберігала свою активність у присутності 0,001 — 0,05 М перексиду водню, зі зростанням концентрації окисника до 0,1 М і 0,5 М спостерігалось дуже незначне зниження

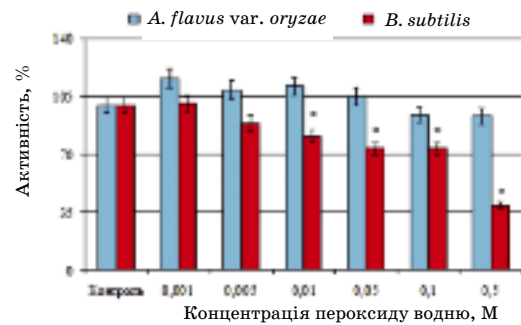


Рис. 14. Вплив перексиду водню на активність  $\alpha$ -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* 80428 та *B. subtilis* 147.

\* Достовірно відмінне від контрольного значення за  $P < 0,05$

рівня активності — на 6% і 7% відповідно.  $\alpha$ -Амілаза *B. subtilis* 147 також виявилася достатньо стійкою до дії перексиду водню і зберігала 89% — 74% активності за його концентрації 0,005 М — 0,1 М, зростання ж концентрації цієї речовини до 0,5 М зумовлювало зниження активності ензиму на 61%. Подібні результати були отримані для  $\alpha$ -амілази *Bacillus* sp. BKL20, яка у разі додавання 0,5 М перексиду водню після 30 хв інкубування зберігала 24% своєї активності, а в присутності 1–10 мМ окисника була повністю стабільною [7]. На противагу отриманим даним,  $\alpha$ -амілаза *Bacillus* sp. PN5 втрачала 30% своєї активності у присутності лише 5 мМ перексиду водню після 1 год інкубування [31]. А  $\alpha$ -амілаза *B. cohnii* US147 з додаванням 1 мМ окисника після 15 хв інкубування зберігала 77% активності [20]. Є дані щодо  $\alpha$ -амілази *Bacillus* KSM-K38, яка зберігає активність у присутності 1,8 М перексиду водню, однак цей ензим є менш термостабільним порівняно з  $\alpha$ -амілазою *B. subtilis* 147 [32].

Таким чином, здатність  $\alpha$ -амілаз *A. flavus* var. *oryzae* 80428 та *B. subtilis* 147 ефективно розщеплювати як розгалужені, так і лінійні крохмалевмісні субстрати й витримувати високі концентрації неіоногенних та аніонних детергентів, денатуранту (сечовини) та окисника (перексиду водню), уможливить у майбутньому використання цих ензимів у різних галузях промисловості, де переробляють крохмалевмісну сировину, передусім у виробництві мийних засобів.

Висловлюємо подяку співробітникам відділів антибіотиків (к. б. н. Сафроновій Л. А.) і фізіології та систематики мікроміцетів (д. б. н. Ждановій Н. М., к. б. н. Курченко І. М., к. б. н. Харкевич О. С.) за надані для дослідження штами мікроорганізмів.



## ЛІТЕРАТУРА

1. Anto H., Trivedi U., Patel K. Alpha amylase production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 using solid-state fermentation // Food Technol. Biotechnol. — 2006. — V. 44, N 2. — P. 241–245.
2. Metin K., Koc Ç., Ateslier Z. B. B., Biyik H. H. Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase produced by *Penicillium citrinum* HBF62 // Afr. J. Biotechnol. — 2010. — V. 9, N 45. — P. 7692–7701.
3. Mojsov K. Microbial alpha-amylases and their industrial applications: a review // Int. J. Manag. IT Engin. — 2012. — V. 2, N 10. — P. 583–609.
4. Talekar S., Patil J. Production and characterization of thermostable alpha amylase by *Bacillus stearothermophilus* NCIM 2922 // J. Cell Tissue Res. — 2012. — V. 12, N 1. — P. 3037–3042.
5. Das S., Singh S., Sharma V., Soni M. L. Biotechnological applications of industrially important amylase enzyme // Int. J. Pharm. Sci. — 2011. — V. 2, Is. 1. — P. 486–496.
6. Авдюк Е. В., Варбанец Л. Д., Сафронова Л. А., Харкевич Е. С. Очистка  $\alpha$ -амилаз *Aspergillus flavus* var. *oryzae* и *Bacillus subtilis* и их свойства // Біотехнологія. — 2012. — Т. 5, № 5. — С. 91–99.
7. Kubrak O. I., Storey J. M., Storey K. B., Lushchak V. I. Production and properties of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. BKL20 // Can. J. Microbiol. 2010. V. 56, N 4. P. 279–288.
8. Варбанець Л. Д., Борзова Н. В. Глікозидази мікроорганізмів і методи їх дослідження // К.: Наук. думка, 2010. — 440 с.
9. Uma Maheswar Rao J. L., Satyanarayana T. Purification and characterization of a hyperthermostable and high maltogenic  $\alpha$ -amylase of an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans* // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2007. — V. 142, N 2. — P. 179–193.
10. Hmidet N., Maalej H., Haddar A., Nasri M. A novel  $\alpha$ -amylase from *Bacillus mojavensis* A21: purification and biochemical characterization // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2010. — V. 162, Is. 4. — P. 1018–1030.
11. Gangadharan D., Nampoothiri K. M., Sivaramakrishnan S., Pandey A. Biochemical characterization of raw-starch-digesting alpha amylase purified from *Bacillus amyloliquefaciens* // Ibid. — 2008. — V. 158, Is. 3. — P. 653–662.
12. Mohamed S. A., Azhar E. I., Ba-Akdah M. M. et al. Production, purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from *Trichoderma harzianum* grown on mandarin peel // AJMR. — 2011. — V. 5, N 9. — P. 1018–1028.
13. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты (том 1). — М.: Мир, 1982. — 195 с.
14. Sreenivasa Rao K., Ellaiah P., Karnakumar Biradar V. Purification and characterization of thermostable amylase from a strain of *Thermoactinomyces thalophilus* KSV 17 // RGHHS J. Pharm. Sci. — 2012. — V. 2, Is. 1. — P. 83–89.
15. Gulelat Haki D., Alfredo Anceno J., Sudip Rakshit K. Atypical  $\text{Ca}^{2+}$ -independent, raw-starch hydrolyzing  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. GRE1: characterization and gene isolation // World J. Microbiol. Biotechnol. — 2008. — V. 24, N 11. — P. 2517–2524.
16. Ezeji T. C., Bahl H. Purification, characterization, and synergistic action of phytate-resistant  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase from *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10 // J. Biotechnol. — 2006. — V. 125, N 1. — P. 27–38.
17. Nouadri T., Meraihi Z., Shahrazed D.-D., Leila B. Purification and characterization of the  $\alpha$ -amylase isolated from *Penicillium camemberti* PL21 // Afr. J. Biotechnol. Resear. — 2010. — V. 4, N 6. — P. 155–162.
18. Yang C.-H., Liu W.-H. Purification and properties of a maltotriose-producing  $\alpha$ -amylase from *Thermobifida fusca* // Enz. Microb. Technol. — 2004. — V. 35, N 2–3. — P. 254–260.
19. Amutha K., Jaya Priya K. Effect of pH, temperature and metal ions on amylase activity from *Bacillus subtilis* KCX 006 // Int. J. Pharm. Bio Sci. — 2011. — V. 2, Is. 2. — P. 407–413.
20. Ghorbel R. E., Makouf S., Massoud E. B. et al. New thermostable amylase from *Bacillus cohnii* US147 with a broad pH applicability // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2008. — V. 157, N 1. — P. 50–60.
21. Ikram-ul-Haq, Javed M. M., Hameed U., Adnan F. Kinetics and thermodynamic studies of alpha amylase from *Bacillus licheniformis* mutant // Pak. J. Bot. — 2010. — V. 42, N 5. — P. 3507–3516.
22. Гермашева И. И., Глухарёва Н. А., Прохорова Г. В. Взаимодействие L-лизина с додецилсульфатом натрия // Научн. вед. БелГУ. — 2011. — Т. 14, № 3. — С. 174–178.
23. Arikan B. Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from thermophilic *Bacillus* sp. isolate A3-15 // Bioresour. Technol. — 2008. — V. 99, N 8. — P. 3071–3076.
24. Anupama A., Jayaraman G. Detergent stable, halotolerant  $\alpha$ -amylase from *Bacillus aquimaris* VITP4 exhibits reversible unfolding // Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol. — 2011. — V. 2, Is. 2. — P. 366–376.
25. Liu J., Zhang Z., Dang H. et al. Isolation and characterization of a cold-active amylase from marine *Wangia* sp. C52 // Afr. J. Microbiol. Res. — 2011. — V. 5, N 10. — P. 1156–1162.
26. Satheesh Kumar G., Subhosh Chandra M., Mallaiiah K. V. et al. Purification and characterization of highly thermostable  $\alpha$ -amylase from thermophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius* // Biotechnol. Bioproc. Eng. — 2010. — V. 15, N 3. — P. 435–440.
27. Ozean B. D., Baylan M., Ozean N., Tekdal D. Characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate DM-15 // Res. J. Biol. Sci. — 2010. — V. 5, N 1. — P. 118–124.
28. Koki H. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology // Microbiol. Mol. Biol. Rev. — 1999. — V. 63, N 4. — P. 735–750.
29. Oliveira A. N., Oliveira L.A., Andrade J. S. Partial characterization of amylases of two indigenous central amazonian rhizobia stra-

- ins // Braz. Arch. Biol. Technol. — 2010. — V. 53, N 1. — P. 35–45.
30. *Bano S., Qader S. A. U., Aman A., Azhar A.* Partial purification and some properties of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS // Ind. J. Biochem. Biophys. — 2009. — V. 46, N 5. — P. 401–404.
31. *Saxena R. K., Dutt K., Agarwal L., Nayyar P.* A highly thermostable and alkaline amylase from

- a *Bacillus* sp. PN5 // Bioresour. Technol. — 2007. — V. 98, N 2. — P. 260–265.
32. *Hagihara H., Igarashi K., Hayashi Y. et al.* Novel  $\alpha$ -amylase that is highly resistant to chelating reagents and chemical oxidants from the alkaliphilic *Bacillus* isolate KSM-K38 // Appl. Environ. Microbiol. — 2001. — V. 67, N 4. — P. 1744–1750.

**$\alpha$ -АМИЛАЗЫ *Aspergillus flavus* var. *oryzae*  
И *Bacillus subtilis*: СУБСТРАТНАЯ  
СПЕЦИФИЧНОСТЬ И УСТОЙЧИВОСТЬ  
К РЯДУ ХИМИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ**

*Е. В. Авдюк, Л. Д. Варбанец*

Институт микробиологии и вирусологии  
НАН Украины, Киев

*E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua*

Изучена способность  $\alpha$ -амилаз двух продуцентов — *Aspergillus flavus* var. *oryzae* 80428 и *Bacillus subtilis* 147 расщеплять разные углеводсодержащие субстраты, такие как мальтоза, сахароза, трегалоза, декстрин,  $\alpha$ - и  $\beta$ -циклодекстрин, амилоза, амилопектин, гликоген, пуллулан, растворимый картофельный, нерастворимый картофельный, кукурузный, пшеничный крахмалы, декстран 500. Показано, что исследованные энзимы отличаются по субстратной специфичности.  $\alpha$ -Амилаза *A. flavus* var. *oryzae* 80428 эффективнее гидролизует растворимый картофельный и пшеничный крахмалы, в то время как  $\alpha$ -амилаза *B. subtilis* 147 — только пшеничный. Энзимы обоих продуцентов не расщепляют мальтозу,  $\alpha$ -циклодекстрин и декстран 500. Очень низкая способность гидролизовать пуллулан обнаружена у  $\alpha$ -амилазы *A. flavus* var. *oryzae* 80428, а  $\alpha$ -амилаза *B. subtilis* 147 вообще не действует на него. Самые низкие значения константы Михаэлиса для обоих энзимов получены при расщеплении гликогена, что свидетельствует о наибольшей аффинности именно к этому субстрату. Изучение влияния химически активных веществ на активность исследуемых энзимов показало, что  $\alpha$ -амилазы *A. flavus* var. *oryzae* 80428 и *B. subtilis* 147 устойчивы к мочеvine, дезоксихолевой кислоте, Твину-80, Тритону X-100 и пероксида водорода, т. е. они являются конкурентоспособными с ранее описанными энзимами. Это даст возможность в будущем использовать данные энзимы в разных отраслях промышленности, прежде всего при изготовлении моющих средств.

**Ключевые слова:** *Aspergillus flavus* var. *oryzae*, *Bacillus subtilis*,  $\alpha$ -амилаза, субстратная специфичность, константа Михаэлиса.

**$\alpha$ -AMYLASES OF *Aspergillus flavus* var. *oryzae*  
AND *Bacillus subtilis*: THE SUBSTRATE  
SPECIFICITY AND RESISTANCE  
TO A NUMBER OF CHEMICALLY ACTIVE  
SUBSTANCES**

*K. V. Avdiyuk, L. D. Varbanets*

Institute of Microbiology and Virology of  
National Academy of Sciences of Ukraine, Kiyv

*E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua*

The ability of *Aspergillus flavus* var. *oryzae* 80428 and *Bacillus subtilis* 147  $\alpha$ -amylases to split different carbohydrate-containing substrates, such as maltose, sucrose, trehalose, dextrin,  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrin, amylose, amylopectin, glycogen, pullulan, soluble starch, insoluble starch, corn starch, wheat starch, dextran 500 has been studied. It was shown that investigated enzymes differ by substrate specificity.  $\alpha$ -Amylase of *A. flavus* var. *oryzae* 80428 rapidly hydrolysed soluble potato and wheat starch, while the  $\alpha$ -amylase of *B. subtilis* 147 did only wheat starch. Both enzymes don't cleave maltose,  $\alpha$ -cyclodextrin and dextran 500. *A. flavus* var. *oryzae* 80428  $\alpha$ -amylase display very small ability to hydrolyze pullulan, while  $\alpha$ -amylase of *B. subtilis* 147 it does not act in general. The lowest values of Michaelis constant for both enzymes at splitting of glycogen have been obtained, indicating that enzymes have the greatest affinity to this substrate. The studies of influence of chemically active substances on activity of *A. flavus* var. *oryzae* 80428 and *B. subtilis* 147  $\alpha$ -amylases show there are resistant to urea, deoxycholic acid, Tween-80, Triton X-100 and hydrogen peroxide. It's indicate the enzymes tested may be competitive in compare with earlier described in literature enzymes. The obtained results give a possibility to propose in future usage these enzymes in different fields of industry, foremost in detergent industry.

**Key words:** *Aspergillus flavus* var. *oryzae*, *Bacillus subtilis*,  $\alpha$ -amylase, substrate specificity, Michaelis constant.

## ЕНЗИМНИЙ КОНДУКТОМЕТРИЧНИЙ БІОСЕНСОР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ФРУКТОЗИ

О. Є. Дудченко<sup>1,2</sup>

В. М. Пешкова<sup>1</sup>

О. О. Солдаткін<sup>1</sup>

О. П. Солдаткін<sup>1,2</sup>

С. В. Дзядевич<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

<sup>2</sup>Інститут високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Україна

E-mail: dc182@yandex.ru

Отримано 05.07.2012

Розроблено кондуктометричний біосенсор для визначення фруктози, який функціонує на основі ензиму фруктозодегідрогенази та медіатора електронів фериціаніду калію. Ензим було коімобілізовано разом із сироватковим альбуміном бика на поверхні кондуктометричного перетворювача методом попережного зшивання глутаровим альдегідом. Підібрано оптимальні умови функціонування біосенсора. Досліджено залежність його роботи від концентрації робочого буферного розчину та концентрації в ньому медіатора електронів фериціаніду калію. Біосенсор виявляв високу відтворюваність сигналу та селективність стосовно фруктози. Показано, що розроблений кондуктометричний біосенсор можна використовувати для моніторингу вмісту фруктози в харчових продуктах та в медичній діагностиці.

**Ключові слова:** кондуктометричний біосенсор, фруктоза, фруктозодегідрогеназа, фериціанід калію.

Фруктоза — поширений у природі моносахарид, найбільше її міститься у фруктах, зокрема у винограді, яблуках, грушах, бананах [1]. Вона входить також до складу бджолиного меду й олігосахаридів: рафінози, сахарози, стахіози, полісахаридів інуліну та левану. Завдяки високій гігроскопічності фруктозу дедалі частіше застосовують у виробництві мармеладу, цукерок, пряників, печива та інших солодощів, оскільки вона дає змогу затримати процес черствіння продуктів. На сьогодні фруктоза є одним з найперспективніших замінників цукру під час профілактики та лікування цукрового діабету, адже вона добре засвоюється організмом людини і, на відміну від глюкози, не потребує присутності інсуліну [2]. Окрім того, фруктоза не сприяє розвитку зубного карієсу на відміну від глюкози або сахарози [1].

Надлишок фруктози в крові та сечі людини свідчить про порушення її метаболізму, зокрема про есенціальну фруктозурію, фруктоземію та спадкову недостатність фруктозо-1,6-дифосфатази, тому для виявлення цих порушень слід проводити лабораторний аналіз фруктози в крові та сечі. Для діагностики фруктозурії роблять лабораторний аналіз сечі з метою виявлення фруктози, яка у хворих людей накопичується у великій кількості. Дієта пацієнтів з вище-

зазначеними захворюваннями передбачає вилучення з їхнього раціону будь-яких фруктозовмісних продуктів та напоїв [3], тому виробництво дієтичних продуктів харчування для людей з непереносимістю фруктози передбачає обов'язковий контроль рівня фруктози в готовій продукції.

У деяких випадках рівень фруктози в продуктах харчування є показником їхньої якості. Наприклад, кількість фруктози у бджолиному меду, а також співвідношення її з кількістю інших цукрів свідчить про зрілість меду, метод та кліматичні умови його виготовлення і зберігання, ймовірність фальсифікації меду тощо [4].

У медицині визначення фруктози є дуже важливим. Так, аналіз фруктози здійснюють під час проведення спермограми. Її рівень у спермі є вагомим для діагностики обструктивної азооспермії, запалень сім'яних пухирців, передміхурової залози та бульбоуретральних залоз у чоловіків. Також аналіз на рівень фруктози у спермі може сприяти коректній діагностиці ретроградної еякуляції [5, 6].

З огляду на це необхідними є зручні, точні, селективні, швидкі та дешеві методи моніторингу фруктози в харчовій, біотехнологічній промисловості та в медицині. Існуючі на сьогодні стандартні методи висо-



коточного визначення фруктози, такі як рідинна та високоефективна рідинна хроматографія, потребують наявності кваліфікованого персоналу, складного і високовартісного обладнання [7] та досить непростой попередньої підготовки проб для аналізу. Інші методи, зокрема поляриметрія, рефрактометрія та хімічні, є простішими і швидшими у виконанні, але менш точними й селективними. Створення біосенсора для визначення фруктози може поліпшити систему моніторингу вмісту фруктози в харчових продуктах та в медичній діагностиці.

У літературі описано різні варіанти біосенсорів для визначення фруктози, більшість з яких є ензимними електрохімічними біосенсорами [8–16]. Існують також мікробні біосенсори для визначення фруктози. Є повідомлення про розроблення амперометричної біосенсорної системи для визначення фруктози, сахарози та глюкози з іммобілізованими на поверхні золотих електродів клітинами трьох різних мутантних штамів *Escherichia coli* K12, кожен з яких був специфічним до одного з трьох сахаридів [17].

У роботі більшості існуючих нині біосенсорів для визначення фруктози використовують ензим фруктозодегідрогеназу (ФДГ) та різні медіатори електронів. У роботах [8, 13] описано кілька варіантів ензимного амперометричного біосенсора, створених шляхом нанесення ФДГ, медіатора фероцену та нафіону у складі целюлозоацетатної мембрани на поверхню скловуглецевого електрода з метою запобігання вимиванню медіатора з мембрани. Автори [9] повідомляють про амперометричний біосенсор для визначення фруктози в зразках харчових продуктів на основі ензиму ФДГ, включеного в карбонову пастову матрицю разом з медіатором  $\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}$ . Є дані про метод виготовлення амперометричного безмедіаторного біосенсора для визначення фруктози [10], в якому ФДГ іммобілізується включенням в карбонову пасту, але з додатковим покриттям шару ензиму діалізною мембраною. Автори також відзначають вплив аскорбінової кислоти на вимірювання фруктози. З'ясовано, що за значних концентрацій аскорбінової кислоти в зразках ( $> 0,08$  мМ) такий вплив можна нівелювати, додатково модифікуючи електрод аскорбатоксидазою. У роботі [11] описано ензимний амперометричний біосенсор для визначення фруктози в системі проточно-ін'єкційного аналізу. Ензим ФДГ наносили на карбоновий пастовий електрод у складі попередньо одержаної

суміші ФДГ і графітової пудри. Описано також фруктозні амперометричні біосенсори [12], які одержували, абсорбуючи ФДГ у графітовій матриці з медіаторами фериціанідом або тетраціанохінодимертаном, з подальшим утворенням тонкого непровідного електрополімерного шару 1,3-фенілендіамін-резорцинолу. Проведено порівняння двох різних процедур іммобілізації ФДГ з метою створення амперометричного біосенсора для визначення фруктози [14]. У першому методі ФДГ іммобілізували в шарі поліпіролу на платиновому електроді з фериціанідом калію як медіатором за допомогою електрополімеризації. За іншим методом ФДГ іммобілізували на платиновому електроді ковалентним зв'язуванням з ГА на шарі поліпіролу з фериціанідом. Описано біосенсор для одночасного визначення глюкози і фруктози, який було створено іммобілізацією суміші ГОД, ФДГ та медіатора тетратіафулвалену методом поперечного зшивання з ГА на попередньо модифікованому меркаптопропіоновою кислотою золотому електроді [15]. Є повідомлення про розроблення кількох варіантів біосенсора для визначення фруктози з метою функціонування у складі триканального амперометричного мультибіосенсора для визначення глюкози, фруктози й етанолу [16]. Фруктозу виявляють за допомогою ФДГ та одного з трьох медіаторів: фероцену, 2-гексадеканоу та фериціаніду, які іммобілізували в складі графітової суспензії. У кожному з трьох варіантів біосенсорів під час вимірювання в реакційне середовище додавали 2 мМ фериціаніду калію. Біосенсор з фероценом мав найширший лінійний діапазон визначення, а біосенсор з 2-гексадеканоном характеризувався вищою операційною стабільністю.

Попри велику кількість повідомлень про розроблення амперометричних біосенсорів для визначення фруктози, досі ще не було налагоджено промислового випуску жодної такої системи. Можливо, на заваді цьому стоїть низка недоліків амперометричних біосенсорів, зокрема використання технологічно складного й дорогого електрода порівняння та інтерферуючий вплив електроактивних речовин унаслідок окиснення їх на електроді, чого не відбувається під час роботи з кондуктометричними біосенсорами. До того ж кондуктометричні біосенсори завдяки недорогій сучасній тонкоплівчастій технології виготовлення можуть суттєво мініатюризуватися, що зробить їх використання ще зручнішим [18].

### Матеріали і методи

**Матеріали.** У дослідженнях використовували ліофілізований ензим фруктозодегідрогенази (ЕС 1.1.99.11) з *Gluconobacter* sp. активністю 148 од. акт./мг фірми Sigma-Aldrich Chemie. Сироватковий альбумін бика (БСА) (V фракція), 50%-й водний розчин глутарового альдегіду (ГА) — фірми Sigma-Aldrich Chemie, фруктозу одержали від фірми Fluka. Інші неорганічні сполуки, застосовувані в роботі, були вітчизняного виробництва зі ступенем чистоти «х. ч.» і «ч. д. а.».

Для дослідження застосовували кондуктометричні перетворювачі, виготовлені згідно з нашими рекомендаціями в Інституті фізики напівпровідників ім. В. Є. Лашкарьова НАН України (Київ). Вони мають розмір 5×30 мм і складаються з двох ідентичних пар золотих гребінчастих електродів, виготовлених вакуумним напыленням золота на основу із ситалу (рис. 1). Чутлива поверхня кожної пари електродів становила близько 1,5 мм<sup>2</sup>. Відстань між пальцями гребінок та ширина самих пальців — 20 мкм.



Рис. 1. Зовнішній вигляд кондуктометричного планарного гребінчастого перетворювача

**Приготування біоселективних мембран.** З метою іммобілізації ФДГ на поверхні перетворювача використовували метод поперечного зшивання глутаровим альдегідом. Розчин для створення активної мембрани містив 10% фруктозодегідрогенази, 5% БСА та 20% гліцеролу в 20мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,0. Розчин для референтної мембрани складався з тих самих компонентів, за винятком ензиму ФДГ, який було замінено на аналогічну кількість БСА, кінцева концентрація якого становила 15%. Таким чином, вміст протеїну в розчинах для приготування активної та референтної мембран був однаковим. Перед нанесенням на відповідні пари електродів кожен із цих розчинів окремо змішували з 1%-м водним розчином глутарового альдегіду у співвідношенні 1:1. Нанесення розчинів для активної мембрани та мембрани порівняння на відповідні пари електродів проводили мікропіпеткою Eppendorf. Для завершення іммобілізації перетворювачі

з нанесеними на їхню поверхню розчинами витримували при температурі 24 °С протягом 20 хв. На наступному етапі електроди з іммобілізованими біоселективними мембранами витримували за помірною перемішування у 7,5 мМ цитратфосфатному буферному розчині, рН 5,0, протягом 10 хв, щоб видалити надлишок ГА.

**Установка для досліджень.** Для вимірювання залежності зміни провідності в приелектродному шарі кондуктометричного перетворювача від концентрації фруктози в розчині було використано вимірювальну установку (рис. 2).

З низькочастотного генератора сигналів ГЗ-118 (Україна) змінна напруга з частотою 100 кГц та амплітудою 10 мВ подається на диференційну пару гребінчастих електродів, які з біоселективними мембранами занурюються в робочу комірку з буферним розчином. Отриманий на електродах біосенсора сигнал знімається з опорів навантаження  $R_n = 1$  кОм і через диференційний підсилювач Unipan-233-6 (Польща) надходить на селективний фазочутливий нановольтметр Unipan-232-В (Польща). Після нановольтметра цей сигнал надходить на реєструвальний пристрій.

**Методика вимірювань.** Вимірювання здійснювали у цитратфосфатному буферному розчині різних молярностей, за різних значень рН, при кімнатній температурі (24–25 °С) у відкритій комірці з інтенсивним

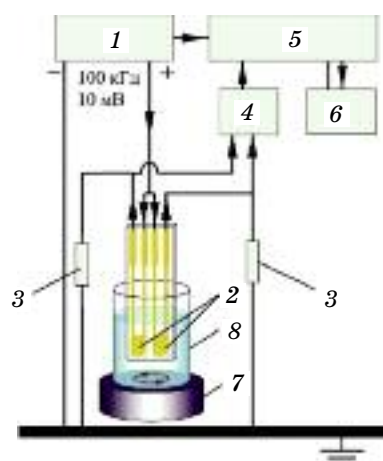


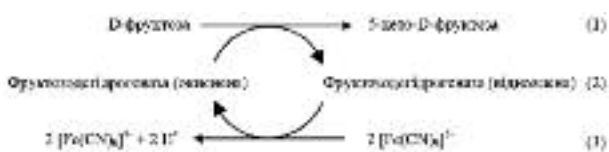
Рис. 2. Схема установки для проведення кондуктометричних вимірювань:

1 — генератор сигналів; 2 — дві пари електродів з активною та референтною мембранами; 3 — опори навантаження; 4 — диференційний підсилювач; 5 — нановольтметр; 6 — реєструвальний пристрій; 7 — магнітний перемішувач; 8 — робоча комірка з буферним розчином (2 мл)

перемішуванням. Щоб одержати стабільний початковий сигнал (базову лінію), кондуктометричний біосенсор деякий час витримували в суміші буферного розчину та фериціаніду калію, який у певній концентрації додавали в робочу комірку щоразу перед внесенням досліджуваного зразка. Далі одержували відгук на внесення в комірку певної аліквоти стандартного концентрованого розчину фруктози. Застосований у роботі диференційний режим вимірювань підвищував чутливість біосенсора завдяки мінімізації шумів та сторонніх неспецифічних сигналів, які виникають через коливання температури, рН середовища, напруги в мережі.

### Результати та обговорення

В основі роботи кондуктометричного біосенсора для визначення фруктози лежить ензиматична реакція, що відбувається за участю медіатора електронів фериціаніду калію:



Фруктозодегідрогеназа каталізує окиснення фруктози до 5-кето-D-фруктози (1), переходячи при цьому у відновлений стан (2). Зворотне окиснення відновленої фруктозодегідрогенази здійснюється за допомогою електронного медіатора фериціаніду калію  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , який слугує акцептором електронів. У результаті такого ензиматичного медіаторного процесу утворюється відновлений фероціанід  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  та протони (3),

унаслідок чого відбувається зміна провідності розчину, що є пропорційною концентрації фруктози, яку реєструють за допомогою кондуктометричного біосенсора [19].

Робота кондуктометричного біосенсора для визначення фруктози істотно залежить від концентрації фериціаніду калію, адже у цій системі він виконує роль медіатора електронів. Аби перевірити, як концентрація фериціаніду калію впливає на чутливість фруктозного біосенсора, проводили серію вимірювань, за яких до вимірювальної комірки з робочим буферним розчином вносили різні концентрації фериціаніду калію (0,5; 2; 5; 10 мМ), після чого одержували відгуки біосенсора на додавання фруктози.

Для підтвердження одержаних результатів експеримент повторювали для двох концентрацій фруктози (0,25 та 0,5 мМ), що знаходяться в лінійному діапазоні роботи біосенсора. За концентрації фериціаніду 0,5 мМ спостерігали дуже низькі відгуки на внесення фруктози, що може пояснюватися недостатнім надходженням фериціаніду в біоселективну мембрану, внаслідок чого ензиматичні та дифузійні процеси у мембрані відбуваються повільніше, ніж у разі використання 2 мМ фериціаніду, за якого відгуки на фруктозу були максимальними. Поступове збільшення концентрації фериціаніду калію до 10 мМ призводить до зниження сигналу біосенсора, оскільки це зумовлює підвищення фонові провідності розчину, внаслідок чого чутливість кондуктометричних біосенсорів зменшується.

В основі кондуктометричного методу, як відомо, лежить вимірювання зміни провідності аналізованого розчину. Зміна провідності може залежати як від самої ензиматичної реакції, так і від характеристик розчину, в якому ця реакція відбувається. Тому в наступному експерименті досліджували вплив концентрації робочого буферного розчину на величину відгуку біосенсора на основі ФДГ. На рис. 4 показано залежність величин відгуків біосенсора від концентрації фруктози у буферних розчинах з різними буферними ємностями розчину (калібрувальні графіки). Аналізуючи отримані калібрувальні криві, встановили, що зі зміною концентрації буферного розчину певною мірою змінюються величини відгуків біосенсора та лінійний діапазон визначення фруктози. Чутливість кондуктометричного біосенсора щодо наявності фруктози виявилася найбільшою у 7,5 мМ цитратфосфатному буферному розчині, рН 5,0. Але в цьому разі біосенсор показував лінійну залежність

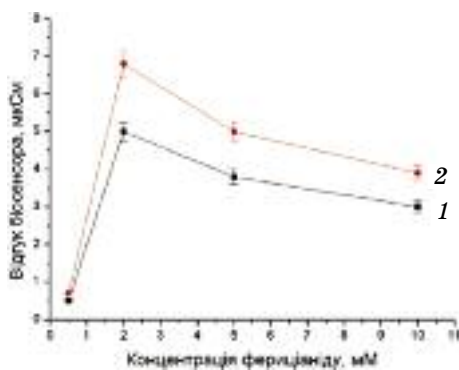


Рис. 3. Графіки залежності відгуків фруктозного біосенсора на внесення 0,25 мМ фруктози (1) та 0,5 мМ фруктози (2) від концентрації фериціаніду калію у вимірювальній комірці: вимірювання проводили у 7,5 мМ цитратфосфатному буферному розчині, рН 5,0

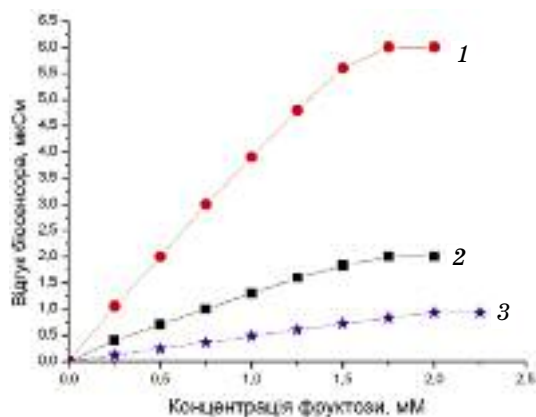


Рис. 4. Графіки залежності величин відгуків фруктозного біосенсора від концентрації фруктози, одержані у 7,5 мМ (1), 15 мМ (2) та 60 мМ (3) цитратфосфатному буферному розчині, рН 5,0; концентрація фериціаніду калію у вимірювальній комірці — 2 мМ

величини відгуку від концентрації фруктози до 1,5 мМ. Під час роботи біосенсора в 15 мМ цитратфосфатному буферному розчині лінійний діапазон визначення фруктози був дещо ширшим. У 60 мМ буфері чутливість біосенсора щодо субстрату суттєво знижувалась, але при цьому лінійний діапазон збільшився до 2 мМ. Тому, використовуючи для проведення аналізу буферні розчини різної концентрації, можна отримувати різні діапазони роботи біосенсора з різною чутливістю, що дає змогу адаптувати його роботу до конкретних прикладних завдань.

Однією з найважливіших характеристик будь-якого біосенсора є відтворюваність його сигналів упродовж роботи. Тому було проведено низку дослідів з перевірки відтворюваності сигналів фруктозного кондуктометричного біосенсора (рис. 5). Для цього багаторазово одержували відгук біосенсора, додаючи 0,5 мМ стандартного розчину фруктози до вимірювальної комірки з робочим буферним розчином у присутності 2 мМ фериціаніду калію. Таку процедуру повторювали протягом робочого дня через кожні 15 хв, здійснюючи дворазове промивання біосенсорів робочим буферним розчином між усіма вимірюваннями. Як впливає з графіка, біосенсор для визначення фруктози характеризувався високою відтворюваністю сигналу, відносно стандартне відхилення результатів становило 3,0%.

Проведення кількісного аналізу реальних зразків на вміст фруктози за допомогою розробленого біосенсора є можливим за відсутності значного впливу з боку інтерферую-

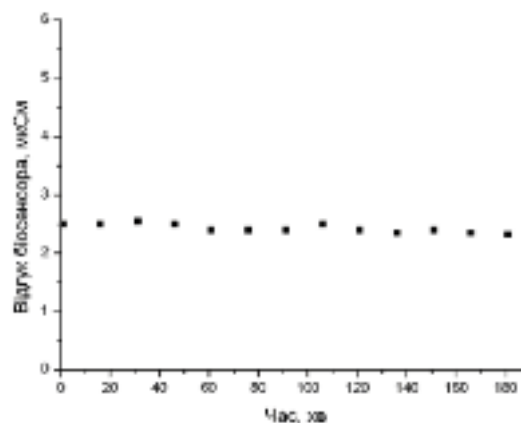


Рис. 5. Відтворюваність сигналів фруктозного кондуктометричного біосенсора з додаванням 0,5 мМ фруктози: вимірювання проводили у 7,5 мМ цитратфосфатному буферному розчині, рН 5,0, у присутності 2 мМ фериціаніду калію

чих речовин (інших сахаридів), що можуть міститись у досліджуваних зразках, оскільки це негативним чином позначиться на точності аналізу. Для випробовування селективності фруктозного біосенсора в робочу комірку із 7,5 мМ цитратфосфатним буферним розчином, рН 5,0, та 2 мМ фериціанідом калію вносили різні потенційні інтерферуючі компоненти в кількості 0,5 мМ. Одержані результати з перевірки селективності наведено в таблиці. Відгуки біосенсора розраховували у відсотках (за 100% було взято відгук біосенсора на 0,5 мМ фруктози).

Згідно з отриманими даними біосенсор для визначення фруктози не дає відгуку на жодну з досліджуваних речовин. Це свідчить про високу специфічність розробленого біосенсора до фруктози, а отже й можливість його застосування без попередньої обробки реального зразка.

З урахуванням результатів, отриманих в експериментах з підбору оптимальних умов

#### Селективність біосенсора для визначення фруктози

0,5 мМ субстанції	Відносний відгук біосенсора, %
Фруктоза	100
Арабіноза	0
Галактоза	0
Маноза	0
Глюкоза	0
Сахароза	0
Мальтоза	0
Лактоза	0
Сорбіт	0



роботи біосенсора, одержали калібрувальний графік залежності величини відгуків біосенсора від концентрації фруктози (рис. 6).

Мінімальна концентрація фруктози, яку можна було визначити біосенсором, стано-

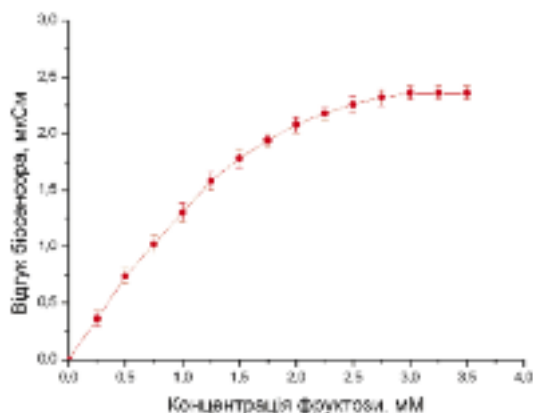


Рис. 6. Калібрувальна крива біосенсора для визначення концентрації фруктози: вимірювання проводили у 7,5 мМ цитратфосфатному буферному розчині, рН 5,0, у присутності 2 мМ фериціаніду калію

вила 0,05 мМ фруктози (відношення сигналу до шуму не менше 3). Лінійну залежність між концентрацією фруктози, яку додавали

в робочу комірку, та відгуком розробленого кондуктометричного біосенсора спостерігали до 1,75 мМ фруктози.

Отже, створено кондуктометричний біосенсор для визначення фруктози на основі ензиму фруктозодегідрогенази та досліджено його головні аналітичні характеристики. Підібрано оптимальну концентрацію фериціаніду калію для функціонування біосенсора — 2 мМ. Встановлено, що зі збільшенням концентрації цитратфосфатного буферного розчину чутливість біосенсора знижується, водночас розширюється лінійний діапазон визначення фруктози. Лінійний діапазон роботи біосенсора становить від 0,05 мМ до 1,75 мМ фруктози. Розроблений біосенсор характеризується високою відтворюваністю сигналів та селективністю до фруктози. Таким чином, цей кондуктометричний біосенсор можна застосовувати для моніторингу вмісту фруктози в харчових продуктах та в медичній діагностиці.

Роботу виконано за фінансової підтримки НАН України в рамках комплексної науково-технічної програми «Сенсорні прилади для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб: метрологічне забезпечення та дослідна експлуатація».

## ЛІТЕРАТУРА

1. Дорохович В. Фруктоза имеет наибольшую сладость среди заменителей сахара // Хлібопек. кондитер. пром. України. — 2011. — № 1. — С. 38–39.
2. Barclay T., Ginic-Markovic M., Cooper P. D., Petrovsky N. The chemistry and sources of fructose and their effect on its utility and health implications // J. Excip. Food Chem. — 2012. — N 3. — P. 67–81.
3. Строчкова Т. В., Журкова Н. В., Павловская Е. В., Каганов Б. С. Наследственные метаболические болезни печени: 1. Нарушения метаболизма углеводов; 2. Лизосомные болезни накопления // Вопр. практ. педиатр. — 2009. — Т. 4, № 5. — С. 28–37.
4. Guler A., Bakan A., Nisbet C., Yavuz O. Determination of important biochemical properties of honey to discriminate pure and adulterated honey with sucrose (*Saccharum officinarum* L.) syrup // Food Chem. — 2007. — V. 105, N 3. — P. 1119–1125.
5. Lu J., Chen F., Xu H. et al. Standardization and quality control for determination of fructose in seminal plasma // J. Androl. — 2007. — V. 28, N 2. — P. 207–213.
6. Anderson R., Reddy J. M. Jr., Oswald C., Zaneveld L. J. D. Enzymic determination of fructose in seminal plasma by initial rate analysis // Clin. Chem. — 1979. — V. 25, N 10. — P. 1780–1782.
7. Birch G.G. Methods of carbohydrate analysis // Asean J. Sci. Technol. development. — 1985. — N 1. — P. 88–97.
8. Tkac J., Vostiar I., Gemeiner P., Strudik E. Stabilization of ferrocene leakage by physical retention in a cellulose acetate membrane. The fructose biosensor // Bioelectrochemistry. — 2002. — V. 55. — P. 149–151.
9. Parades P. A., Parellada J., Fernandez V. M. et al. Amperometric mediated carbon paste biosensor based on D-fructose dehydrogenase for the determination of fructose in food analysis // Biosens. Bioelectron. — 1997. — V. 12, N 12. — P. 1233–1243.
10. Ikeada T., Matsushita F., Senda M. Amperometric fructose sensor based on direct bioelectrocatalysis // Ibid. — 1991. — V. 6. — P. 299–304.
11. Parellada J., Dominguez E., Fernandez V. M. Amperometric flow injection determination of fructose in honey with a carbon paste sensor based on fructose dehydrogenase // Anal. Chim. Acta. — 1996. — V. 330. — P. 71–77.
12. Bassi A. S., Lee E., Zhu J.-X. Carbon paste mediated, amperometric, thin film biosensors for fructose monitoring in honey // Food

- Res. Intern. — 1998. — V. 31, N 2. — P. 19–127.
13. Tkac J., Vostiar I., Gemeiner P. et al. Fructose biosensor based on D-fructose dehydrogenase immobilized on a ferrocene-embedded cellulose acetate membrane // Anal. Chim. Acta. — 2001. — V. 439, N 1. — P. 39–46.
  14. Garcia C. A. B., Neto G., Kubota L. T. New fructose biosensors utilizing a polypyrrole film and D-fructose 5-dehydrogenase immobilized by different processes // Ibid. — 1998. — V. 374. — P. 201–208.
  15. Campuzano S., Loaiza O., Pedrero M. et al. An integrated bienzyme glucose oxidase–fructose dehydrogenase–tetrathiafulvalene–3–mercaptopropionic acid–gold electrode for the simultaneous determination of glucose and fructose // Bioelectrochemistry. — 2004. — V. 63. — P. 199–206.
  16. Miertus S., Katrlík J., Pizzariello A. et al. Amperometric biosensors based on solid binding matrices applied in food quality monitoring // Biosens. Bioelectron. — 1998. — V. 13. — P. 911–923.
  17. Held M., Schuhmann W., Jahreis K., Schmidt H. L. Microbial biosensor array with transport mutants of *Escherichia coli* K12 for the simultaneous determination of mono- and disaccharides // Ibid. — 2002. — V. 17. — P. 1089–1094.
  18. Kissinger P. T. Biosensors — a perspective // Ibid. — 2005. — V. 20. — P. 2512–2516.
  19. Trivedi U. B., Lakshminarayana D., Kothari I. L. et al. Amperometric fructose biosensor based on fructose dehydrogenase enzyme // Sens. Act. B. — 2009. — V. 136. — P. 45–51.

### ЭНЗИМНЫЙ КОНДУКТОМЕТРИЧЕСКИЙ БИОСЕНСОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФРУКТОЗЫ

А. Е. Дудченко<sup>1,2</sup>, В. Н. Пешкова<sup>1</sup>,  
А. А. Солдаткин<sup>1</sup>, А. П. Солдаткин<sup>1,2</sup>,  
С. В. Дзядевич<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии и генетики  
НАН Украины, Киев

<sup>2</sup>Институт высоких технологий  
Киевского национального университета  
имени Тараса Шевченко, Украина

E-mail: dc182@yandex.ru

Разработан кондуктометрический биосенсор для определения фруктозы, функционирующий на основе ферментов фруктозодегидрогеназы и медиатора электронов феррицианида калия. Фермент был коиммобилизован вместе с бычьим сывороточным альбумином на поверхности кондуктометрического преобразователя методом поперечной сшивки с глутаровым альдегидом. Подобраны оптимальные условия работы биосенсора. Исследована зависимость его функционирования от концентрации рабочего буферного раствора и концентрации в нем медиатора электронов феррицианида калия. Биосенсор обладал высокой воспроизводимостью сигналов и селективностью относительно фруктозы. Показано, что разработанный кондуктометрический биосенсор можно применять для мониторинга содержания фруктозы в пищевых продуктах, а также в медицинской диагностике.

**Ключевые слова:** кондуктометрический биосенсор, фруктоза, фруктозодегидрогеназа, феррицианид калия.

### ENZYME CONDUCTOMETRIC BIOSENSOR FOR FRUCTOSE DETERMINATION

O. Y. Dudchenko<sup>1,2</sup>, V. N. Pyeshkova<sup>1</sup>,  
O. O. Soldatkin<sup>1</sup>, O. P. Soldatkin<sup>1,2</sup>,  
S. V. Dzyadevych<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Molecular Biology and Genetics  
of National Academy of Sciences of Ukraine,  
Kyiv

<sup>2</sup>Institute of High Technologies of Kyiv  
National Taras Shevchenko University, Ukraine

E-mail: dc182@yandex.ru

The conductometric biosensor for fructose determination based on fructose dehydrogenase and potassium ferricyanide mediator as electron acceptor has been developed. The enzyme was immobilized on a surface of the conductometric transducer together with bovine serum albumin using crosslinking with glutaraldehyde. Working conditions of the described fructose biosensor were optimized. The results concerning influence of the buffer solution concentration and potassium ferricyanide concentration on the biosensor performance are given. The fructose biosensor is characterized by high signal reproducibility and selectivity to fructose. The developed conductometric biosensor can be successfully used for fructose monitoring in the procedures of food and clinical diagnostic.

**Key words:** conductometric biosensor, fructose, fructose dehydrogenase, potassium ferricyanide.



УДК 54.057+547.311+576.5+577+615.9+616-006

# ДІЯ ДОКСОРУБІЦИНУ, ДОСТАВЛЕНОГО В ПУХЛИННІ КЛІТИНИ *in vitro* ТА *in vivo* НОВИМ НАНОРОЗМІРНИМ ФУНКЦІОНАЛЬНИМ ОЛІГОЕЛЕКТРОЛІТНИМ НОСІЄМ

Н. М. Бойко<sup>1</sup>  
Ю. В. Сеньків<sup>1,3</sup>  
Є. А. Шляхтіна<sup>1,3</sup>  
О. В. Ключівська<sup>1</sup>  
Н. Р. Скорохід<sup>1</sup>  
Н. Є. Міміна<sup>2</sup>  
Т. В. Скорохода<sup>2</sup>  
М. М. Москвін<sup>2</sup>  
О. С. Заїченко<sup>2</sup>  
Р. С. Стойка<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Інститут біології клітини НАН України, Львів, Україна

<sup>2</sup>Національний університет «Львівська політехніка», Україна

<sup>3</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка,  
Україна

E-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

Отримано 13.12.2012

Одним із головних завдань сучасної біофармацевтики є розроблення нових нанорозмірних носіїв з низькою токсичністю, заданим розміром, регульованим відгуком на локальні та віддалені впливи, можливостями візуалізації дії ліків і результатів діагностики. У цій роботі використовували новий олігомерний носій ВА-МАНГ-МП для доставлення протипухлинного препарату доксорубіцину в пухлинні клітини різних ліній. Синтезований олігомерний носій було додатково функціоналізовано фосфатидилхоліном. Показано, що таке доставлення доксорубіцину до клітин-мішеней дає змогу знизити його діючу цитотоксичну дозу в 10 разів порівняно з дозою вільного доксорубіцину за збереження однакового за рівнем антинеопластичного ефекту. Цей дозовий ефект було продемонстровано як *in vitro* на різних пухлинних клітинах ссавців, так й *in vivo* на мишах з експериментальною лімфою NK/Ly. Дія іммобілізованого доксорубіцину супроводжувалась інтенсивнішим, ніж за дії вільного доксорубіцину, утворенням везикул на поверхні клітин-мішеней *in vitro* та міжнуклеосомною фрагментацією їхньої ДНК, а також вищою часткою мертвих клітин в асцитній рідині мишей із лімфою NK/Ly, яким вводили препарат.

Отже, синтезований нанорозмірний носій на основі олігоелектролітів є перспективною системою для доставлення протипухлинних препаратів у клітини-мішені.

**Ключові слова:** доставлення доксорубіцину, пухлинні клітини, олігоелектроліти, нанорозмірні частинки.

Незважаючи на значний прогрес у галузі біології та молекулярної генетики пухлин, а також діагностики і профілактики онкологічних захворювань проблему лікування раку ще не вирішено. Головними перешкодами є пізні діагностування пухлини, неадекватні стратегії боротьби з метастазами, швидкий розвиток резистентності пухлин до хіміотерапевтичних препаратів, а також негативні побічні ефекти, характерні для дії більшості з них. Встановлено, що упродовж одного року застосування хіміотерапевтичного лікування хворих на рак від третини до половини клітин пухлин набувають резистентності до первинної цитотоксичної дії різних протипухлинних препаратів [1]. Одним із головних механізмів, що лежать в

основі цього явища, є функціонування систем мембранного транспорту клітини, які можуть забезпечувати множинну стійкість до ліків (MDR — multidrug resistance) [2]. Тому розроблення нових ліків, здатних діяти на ці клітини з резистентністю до найбільш вживаних протипухлинних препаратів (зокрема доксорубіцину, цисплатину, вінкрестину, таксолу), а також різноманітних систем (наночастинки, міцелярні полімери тощо) адресного доставлення цих препаратів є пріоритетними завданнями біотехнології та фармацевтичної промисловості.

Нові нанорозмірні багатфункціональні носії протипухлинних препаратів викликають навіть більше зацікавлення, ніж самі ці

препарати природного чи синтетичного походження, що мають достатньо високий антинеопластичний потенціал. Особливий інтерес становлять біосумісні та біодеградабельні полімери, що утворюють нанорозмірні частинки, мають достатньо високу стабільність в організмі, низьку токсичність, адекватний гідрофільно-гідрофобний баланс і завдяки своїй унікальній хімічній структурі можуть бути додатково функціоналізовані для підвищення адресності доставлення іммобілізованих на них ліків до специфічних клітин-мішеней і біомолекул. Використання таких нанорозмірних носіїв уможливує суттєве зниження дози лікарського препарату, що є необхідною для досягнення біологічної дії.

Цьому сприяє й ефект посиленої проникності та затримки (enhanced permeability and retention (EPR) effect) ліків в організмі хворого на рак [3]. Його суть полягає в тому, що час затримки в пухлині протипухлинного препарату, іммобілізованого на наночастинці, є суттєво більшим, ніж час затримки вільного препарату, який швидко виводиться з організму і тому перестає діяти. Полегшеному надходженню наночастинок, навантажених лікувальним препаратом, у пухлину сприяють також особливості будови стінки кровоносних судин поблизу пухлини, що є менш щільними порівняно зі стінкою судин у нормальній тканині чи органі [3]. Отже, завдяки EPR ефективність дії протипухлинного препарату, введеного в організм у складі наночастинки, є істотно вищим, ніж ефективність цього самого препарату у вільному стані.

Відомим нанокомпозитом (діаметр частинки – 100 нм), який вже використовують у клініці для доставлення протипухлинного препарату, є доксил (Doxil), що являє собою функціоналізовану поліетиленгліколем ліпосому з інкапсульованим доксорубіцином [4]. У літературі описано низку синтетичних полімерів, які суттєво посилювали біологічну дію доксорубіцину *in vitro* та *in vivo* [4, 5]. Однак недоліком як доксилу, так і описаних полімерних носіїв є складність подальшої функціоналізації ліпосом для підвищення адресності дії інкапсульованого протипухлинного препарату. Крім того, багато з описаних полімерних наноносіїв самі є досить токсичними, що гальмує швидке впровадження їх у клінічну практику.

У роботі описано використання нових біосумісних функціональних олігоелектролітів, розміри, реакційна здатність і функціональні властивості яких можуть бути

керованими й адаптованими для доставлення лікарських препаратів. Показано, що іммобілізація доксорубіцину на синтезованому нанорозмірному носіїві суттєво підсилює антинеопластичну дію останнього як *in vitro*, так й *in vivo*. Проаналізовано деякі механізми, що можуть лежати в основі такої підсилення дії доксорубіцину.

## Матеріали і методи

Створення олігомерних носіїв як системи доставлення лікарських препаратів. Олігоелектролітний носій (далі ОeН), який застосовували в цій роботі, було розроблено і синтезовано науково-дослідною групою кафедри органічної хімії Національного університету «Львівська політехніка» під керівництвом к. х. н. О. С. Заїченка [6]. Він є коолігомером вінілацетату (ВА) та малеїнового ангідриду (МАНГ) із кінцевим фрагментом 1-ізопропіл-4-[1-(*трет*-бутилперокси)-1-метилетил]бензену (монопероксин, МП) і одержаний радикальною полімеризацією в середовищі етилацетату при 70 °С, ініційованою N,N'-азоізобутиронітрилом. На рис. 1 показано загальну структуру використаного у цій роботі.

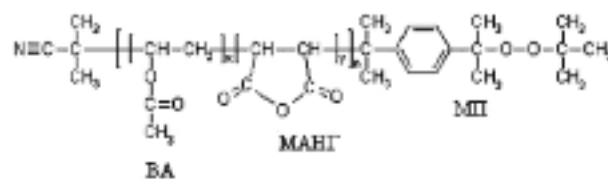


Рис. 1. Схематична структура синтезованого олігоелектролітного носія

Синтезований олігоелектроліт характеризується низькою ( $M_n = 3500-6300$  г/моль) молекулярною масою і вузьким молекулярно-масовим розподілом, розчинний у воді та полярних органічних розчинниках. Завдяки наявності в молекулі гідрофобного фрагмента монопероксину цей олігоелектроліт у водних розчинах утворює надмолекулярні міцелоподібні структури ( $KKM = 0,98-3,77$  ммоль/л).

Для функціоналізації синтезованого олігоелектроліту в органічному розчиннику розчиняли фосфатидилхолін, оліго(ВА-МАНГ-МП) і лікарську субстанцію (в даному разі – доксорубіцин). Одержаний розчин (концентрація лікарського препарату становить  $10^{-3}-10^{-4}$  моль/л) додавали, перемішуючи, до водного розчину 0,9%-го хлориду натрію (фізіологічний розчин).

З метою запобігання агрегації молекул функціонализованого олігоелектроліту, а також для підвищення його проникності крізь плазматичну мембрану клітини нами створено високодисперсні системи, які складаються з нанорозмірних частинок, утворених кон'югатами олігоелектроліт–доксорубіцин. Спосіб їх отримання полягає у використанні фосфоліпиду (фосфатидилхолін) як додаткового гідрофобного стабілізатора і модифікатора поверхні наночастинок. Це не лише дає змогу уникнути агрегації кон'югатів у системі, а й забезпечує полегшення їх ендцитозу крізь клітинну фосфоліпідну мембрану внаслідок спорідненості останньої до поверхні нанорозмірних носіїв. Водну емульсію наночастинок з доксорубіцином диспергували ультразвуком протягом 30 с і одержували частинки розміром близько 170 нм (рис. 2).



Рис. 2. Люмінесценція системи оліго(ВА-МАНГ-МП) з доксорубіцином

Про утворення досить міцних комплексів олігоелектроліт–доксорубіцин свідчать результати тонкошарової хроматографії, які не виявили незв'язаного доксорубіцину у системі. На користь цього свідчать також результати аналізу УФ-спектрів кон'югату. Утворення кон'югату може відбуватися в результаті взаємодії карбоксильних груп носія з аміногрупою доксорубіцину, що не спряжена з хромофором і утворює з носієм комплекс сольового типу.

**Клітини та їх культивування.** У досліджах використовували клітини лінії L1210 гострого лейкозу миші та трансформовані мишачі фібробласти лінії L929 (одержані з колекції Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ). Клітини культивували в середовищі Ігла у модифікації Дульбекко (DMEM, Sigma) із додаванням 10% сироватки крові ембріонів великої рогатої худоби (Sigma). Клітини вирощува-

ли в CO<sub>2</sub>-інкубаторі при температурі 37 °С, концентрації CO<sub>2</sub> 5% і відносній вологості 95%. Пересів клітин проводили у співвідношенні 1:5 через 2–3 дні.

**Дія доксорубіцину та його комплексу з олігомерним носієм.** Для порівняння дії вільного доксорубіцину, доксорубіцину на носіїві та вільного носія концентрацію протипухлинного препарату розраховували за вмістом доксорубіцину. У комплексі, який використовували для дослідження антинеопластичної дії іммобілізованого доксорубіцину, співвідношення носія до препарату становило 30:1. Застосовували доксорубіцин (вільний або іммобілізований на носіїві) у концентраціях 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 і 1 мкг/мл. Вільний носій вносили у 30 разів вищій концентрації, що відповідало кількості носія у його комплексах із доксорубіцином. Ефективність дії досліджуваних речовин визначали за динамікою кількості клітин відносно приросту в контролі (клітини без додавання препаратів, 100%).

**Експериментальні моделі.** Штам лімфоми NK/Ly було надано к. б. н. О. Ю. Придатко з колекції пухлин, перещеплюваних на тваринах в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України (Київ). Штам перещеплювали на мишах лінії BALB/C шляхом доочеревинного введення 0,2 мл асцитної рідини з пухлинними клітинами. Тривалість росту асцитної пухлини становила 5–7 днів, а середня тривалість життя тварини-пухлиноносія без препарату — 25 днів. Ріст пухлин контролювали щоденним зважуванням тварин.

Досліджувані препарати розчиняли в 0,5 мл стерильного фізіологічного розчину і вводили мишам доочеревинно. Уведення лікувальних препаратів здійснювали щодня протягом 8 днів за стандартною схемою лікування лімфом у експериментальних мишей. Спостереження за тваринами і їх зважування проводили до загибелі або повного одужання.

Експерименти на тваринах було проведено згідно з вимогами Європейської конвенції про захист хребетних тварин (13 листопада 1987 р.) і Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (28 березня 2006 р.).

**Визначення цитотоксичної дії досліджуваних речовин.** Клітини лінії L929 висівали у 24-лункові пластикові планшети (Costar, США) в середовищі DMEM за присутності 10%-сироватки крові ембріонів великої рогатої худоби. Через 24 год додавали

досліджувану речовину в різних концентраціях. Клітини лінії L1210 висівали у 96- або 24-лункові планшети. Досліджувану речовину в різних концентраціях додавали відразу після висівання клітин. Підрахунок кількості клітин здійснювали через певні проміжки часу в гемоцитометричній камері Горяєва. Для підрахунку кількості мертвих клітин використовували трипановий синій у кінцевій концентрації 0,01% через 2 хв після його додавання до суспензії клітин.

**Флуоресцентна мікроскопія.** Використовували мікроскопи Мікмед-2-12 (ЛОМО, РФ) і Люам-2Р (ЛОМО, РФ) для одержання цитоморфологічних фотографій після фарбування клітин флуоресцентними барвниками Hoechst 33342, пропідію йодидом і акридиновим оранжевим [6].

**Виділення ДНК клітин та її електрофорез у гелі агарози.** ДНК виділяли з культивованих клітин, як описано [7]. Для цього збирали клітини, двічі промивали їх охолодженим забуференим фізрозчином (ЗФР) й осаджували у мікропробірках Еппендорф центрифугуванням протягом 6 хв при 1 500 об/хв. До осаду клітин додавали лізувальний буфер (20 мМ етилендіамінтетраацетат Na – EDTA, Serva, Німеччина), 50 мМ Трис-HCl, pH 7,5, який містив 1% NP-40 (Sigma, США) і обережно ресуспендували протягом 10 с на льодяній бані. Лізувальний буфер додавали з розрахунку 10 мкл на  $10^6$  клітин. Далі проби центрифугували протягом 5 хв при 5 000 обертів за 1 хв. Надосадову рідину відбирали в чисту пробірку, а осад ще раз ресуспендували в лізувальному буфері та центрифугували упродовж 5 хв при 5 000 об/хв. Надосадові рідини об'єднували і додавали до них 10% SDS (Sigma, США) до кінцевої концентрації 1% та РНКазу А (Sigma, США), розчинену в буфері TE (20 мМ EDTA Na, Serva, Німеччина), 50 мМ Трис-HCl, pH 7,5, до кінцевої концентрації 5 мг/мл та інкубували 2 год при 56 °С. Потім додавали протеїназу К (Sigma, США) до кінцевої концентрації 2,5 мг/мл та інкубували 2 год при 37 °С. Після інкубації до зразків додавали 1/2 об'єму від загального у пробі 10 М ацетату амонію (Sigma, США) і перемішували з 2 об'ємами (від загального у пробі) охолодженого ізопропанолу. Зразки залишали на ніч при -20 °С. ДНК осаджували центрифугуванням протягом 20 хв при 13 000 об/хв, надосадову рідину відкидали, осад промивали 80%-м етиловим спиртом і розчиняли у буфері TE з розрахунку 5–10 мкл на 1 млн. клітин.

Перед проведенням електрофорезу до зразків ДНК додавали буфер для нанесення

(кінцева концентрація: 7% (w/v) сахароза, 0,04% бромфеноловий синій). Зразки вносили в гель з розрахунку ДНК із 5–6 млн. клітин на лунку. ДНК фракціонували електрофорезом в 1% (w/v) гелі агарози (Serva, США), використовуючи трис-ацетатний електродний буфер (буфер ТАЕ: 0,04 М трис-ацетат, pH 8,0, 0,001 М EDTA). Напруга під час електрофорезу становила 5 В/см. Для виявлення ДНК до електродного буфера додавали етидію бромід (кінцева концентрація 2 мкг/мл). Зони ДНК виявляли за їх свіченням в ультрафіолетовому світлі і фотографували через оранжевий світлофільтр цифровою камерою Olympus C4000.

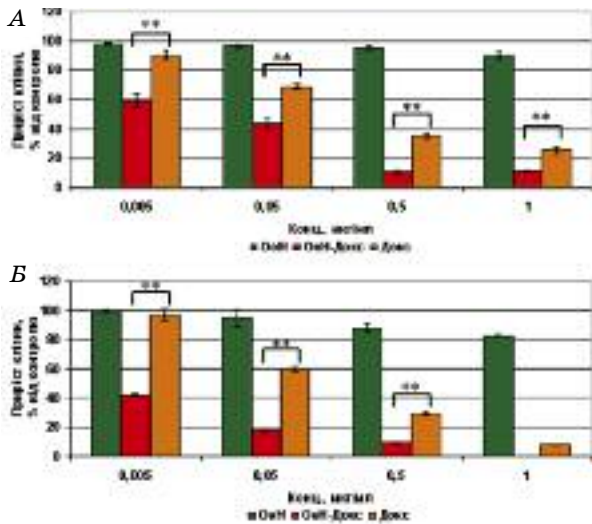
**Статистична обробка результатів.** Усі досліди на клітинах повторювали тричі з трьома паралельними експериментами в кожному варіанті. Кожна точка графіків, наведених на рисунках, та ордината діаграм відповідає середньому значенню  $M$ , розрахованому за результатами трьох вимірювань в одному з кількох однотипних експериментів. Середню квадратичну похибку  $\sigma$  отриманого результату вираховували за величиною середньої похибки  $m$  [7]. На рисунках вона позначена біля кожної точки вертикальною лінією, довжина якої відповідає величині  $\sigma$ . Порівняння двох мінливих величин здійснювали на основі показника вірогідності різниці  $t$  (критерій Стьюдента). Відмінність між величинами вважали достовірною, коли ймовірність різниці  $P$  була меншою за 0,05.

## Результати та обговорення

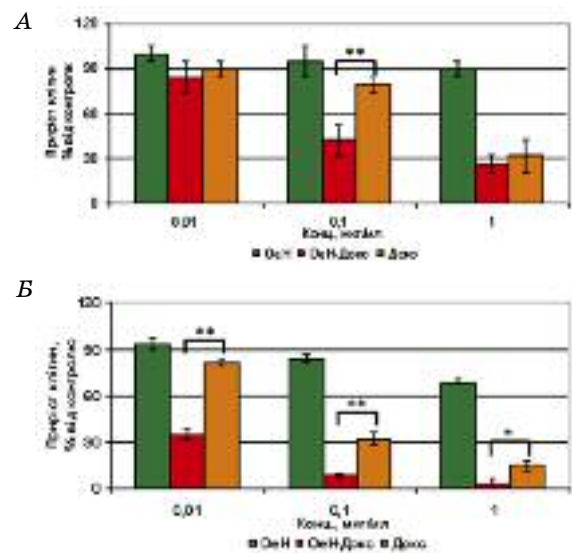
Як видно з рис. 3, вільний олігоелектролітний носій, що не містить іммобілізованого доксорубіцину, не має суттєвого негативного впливу на ріст клітин лінії L1210 лейкозу миші. Це свідчить про його низьку токсичність щодо клітин досліджуваної лінії. Навіть у великих дозах (30 мкг/мл, що відповідає дозі носія з іммобілізованим доксорубіцином у високій концентрації 1 мкг/мл) вільний носій через 48 год істотно не знижував приріст клітин порівняно з контролем.

За дії комплексу ОеН-Докс на клітини лінії L1210 виявлено значне зменшення приросту клітин відносно контролю, що було найбільш вираженим на 48-му год інкубації. У концентрації 0,005 мкг/мл доксорубіцин, іммобілізований на ОеН, діяв подібно до вільної форми цього препарату в концентрації, що була на 2 порядки вища — 0,5 мкг/мл.





**Рис. 3.** Динаміка росту клітин лінії L1210 лейкозу миші за дії вільного доксорубіцину, його комплексу на олігоелектролітному носіїві та вільного носія ОеН: протягом 24 (А) та 48 (Б) год (у відсотках відносно контролю, контроль — 100%). \* —  $P \leq 0,05$ ; \*\* —  $P \leq 0,01$



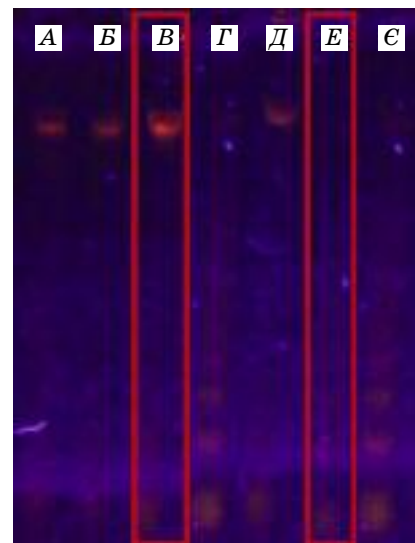
**Рис. 4.** Динаміка росту клітин лінії L929 (трансформовані фібробласти миші) за дії вільного доксорубіцину, його комплексу на олігоелектролітному носіїві та вільного носія ОеН: протягом 24 (А) та 48 (Б) год (у відсотках відносно контролю, контроль — 100%). \* —  $P \leq 0,05$ ; \*\* —  $P \leq 0,01$

У разі використання іншої лінії клітин – трансформованих фібробластів миші L929 для дослідження антинеопластичної дії вільного та іммобілізованого доксорубіцину останній вживали в концентрації 0,01; 0,1; 1 мкг/мл. Вільний носій вносили у концентраціях, що були у 30 разів вищі (рис. 4).

На рис. 4 наведено дані щодо динаміки кількості клітин відносно контролю (100%) через 24 і 48 год. Як видно з рисунка, і на 24-ту, і на 48-му год чітко виражена інгібуюча дія комплексу доксорубіцину з ОеН на трансформовані фібробласти лінії L929. Доксорубіцин у концентрації 0,1 мкг/мл у складі комплексу з носієм пригнічував ріст цих клітин на 24-ту год інкубації аналогічно, а на 48-му год — значно сильніше, ніж вільний доксорубіцин у 10 разів вищій концентрації – 1 мкг/мл (рис. 4, Б).

Руйнування ДНК під час апоптозу у більшості випадків відбувається з утворенням характерних фрагментів, довжина яких кратна довжині однієї нуклеосоми (180–190 пар нуклеотидів). Утворення так званої «драбини ДНК» забезпечують специфічні ендонуклеази, які активуються запущеним у процесі апоптозу каспазним каскадом [8].

Встановлено (рис. 5), що фрагментація ДНК у лейкозних клітинах лінії L1210 за дії доксорубіцину (0,05 мкг/мл), іммобілізованого на олігомерному носіїві ОеН, виражена сильніше, ніж за дії вільного доксорубіцину у цій самій концентрації. Слід зазначити,



**Рис. 5.** Електрофореграма ДНК мишачих лейкозних клітин лінії L1210 в гелі 1% -ї агарози: (А — контроль; Б — 0,005 мкг/мл Докс; В — 0,05 мкг/мл Докс; Г — 1 мкг/мл Докс; Д — 0,005 мкг/мл ОеН-Докс; Е — 0,05 мкг/мл ОеН-Докс; Є — 1 мкг/мл ОеН-Докс)

що за дії вільного доксорубіцину на клітини лінії L1210 зберігається значно більша кількість високомолекулярної незруйнованої ДНК, ніж за дії доксорубіцину (у цій самій концентрації), іммобілізованого на носіїві. Це також свідчить про вищу ефективність антинеопластичної дії доксорубіцину, іммобілізованого на олігоелектролітному носіїві,

порівняно з ефективністю дії вільного доксорубіцину.

Фрагментація клітин на везикули є однією із цитоморфологічних ознак апоптозу, і цей процес може завершуватися цілковитою фрагментацією клітини до так званих апоптичних тілець, оточених плазматичною мембраною [9]. Ми дослідили вплив різних форм (вільної та іммобілізованої) доксорубіцину на формування везикул на поверхні трансформованих мишачих фібробластів лінії L929.

Результати проведеного дослідження свідчать про низьку токсичність олігомерного носія навіть у концентрації 30 мкг/мл після 24 год інкубації, оскільки не було виявлено жодних суттєвих цитоморфологічних змін у клітинах-мішенях (рис. 6, Б) порівняно з інтактними клітинами в контролі (рис. 6, А).

Водночас 24-годинна дія на клітини лінії L929 доксорубіцину (0,1 мкг/мл), іммобілізованого на носіїві ОеН, супроводжується активним утворенням мембранних везикул, характерних для апоптичних клітин (рис. 6, Б).

Окрім того, клітини-мішені за такої дії стають більш заокругленими і втрачають свої довгі відростки, що є характерними ознаками фібробластів. У клітинах, інкубо-

ваних у середовищі з вільним доксорубіцином у концентрації 0,1 мкг/мл, такі морфологічні зміни були виражені значно слабше і розміри мембранних везикул були істотно меншими (рис. 7, А).

Важливу роль у забезпеченні різних цитодеструктивних процесів, що відбуваються під час апоптозу, відіграють специфічні клітинні протеази — каспази. Мішенями дії каспаз можуть слугувати не лише регуляторні, але й структурні протеїни ядра і цитоскелета, зокрема ламіни, актин, Gas2 і  $\alpha$ -фодрин (спектрин нееритроїдних клітин) [7, 10, 11]. Чутливими до дії каспаз є також такі протеїни, як NuMa (nuclear mitotic associated protein) і D4 (інгібітор дисоціації G-протеїну). Наслідком дії каспаз є дезінтеграція ядра й дезагрегація цитоскелета [7]. Велику роль в утворенні апоптичних тілець відіграють мікротрубочки, які забезпечують периферичне розміщення хроматину, створюючи своєрідні примембранні осередки фрагментованих ядер [12].

Оскільки результати наших досліджень, проведених *in vitro*, продемонстрували перспективність олігоелектроліту ВА-МАНГ-МП як носія протипухлинних препаратів було здійснено серію досліджень *in vivo* з використанням цього олігомера для достав-

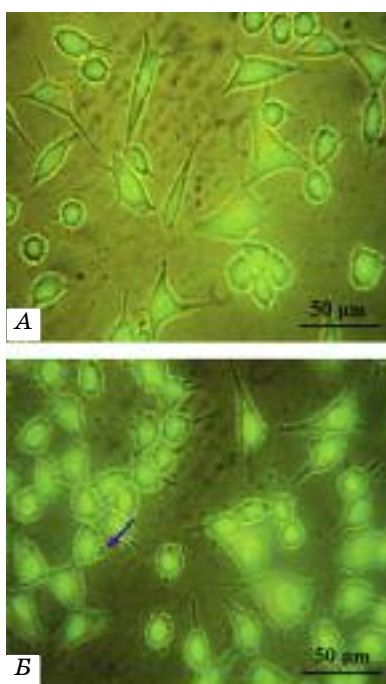


Рис. 6. Фібробласти миші лінії L929, вирощені на середовищі:

без додавання досліджуваного олігоелектролітного носія (А) і за присутності цього носія (Б, контроль) у концентрації 30 мкг/мл (24 год інкубації). Фарбування клітин флуоресцентним барвником акридиновим оранжевим

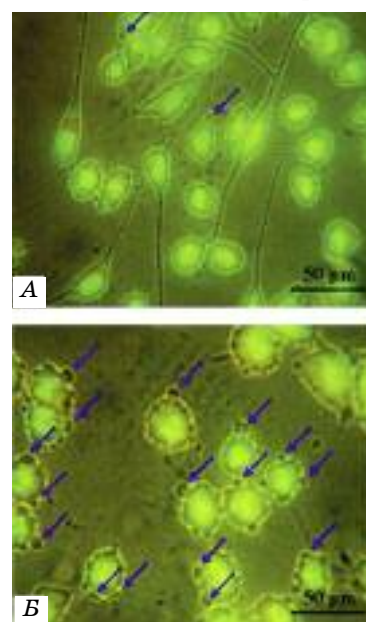


Рис. 7. Фібробласти миші лінії L929, вирощені на середовищі:

з чистим доксорубіцином (0,1 мкг/мл) (А) та на середовищі з олігоелектролітним носієм ОеН з іммобілізованим доксорубіцином (0,1 мкг/мл) після 24 год інкубації (Б). Фарбування клітин флуоресцентним барвником акридиновим оранжевим.

Синіми стрілками позначено утворення мембранних везикул



лення доксорубіцину в клітини мишей-пухлиноносіїв. Для цього мишам лінії BALB/C було прищеплено експериментальну пухлину — лімфому Немета-Келнера NK/Ly. Показано, що введення здоровим мишам розчину вільного носія ОеН у концентраціях 1, 10 і 100 мг на 1 кг маси тіла тварини протягом 8 днів не призводило до їх загибелі чи до будь-якого видимого порушення життєвих функцій тварин. Це свідчить про низьку токсичність олігомера не лише *in vitro*, але й *in vivo* щодо організму миші.

Для лікування мишей із прищепленою лімфомою NK/Ly тваринам вводили вільний доксорубіцин у концентраціях 0,1 та 1 мг/кг маси тіла тварини, а також доксорубіцин, іммобілізований на ОеН (розраховані концентрації доксорубіцину також становили 0,1 та 1 мг/кг маси тіла тварини). Ріст пухлинних клітин в асциті контролювали щоденним зважуванням тварин. За суттєвого (понад 5 г) збільшення маси тіла миші-пухлиноносія внаслідок зростання об'єму пухлинного асциту проводили дренаж асцитної рідини. На ранніх стадіях росту пухлини відбирали 1–2 мл асциту, тоді як на пізніх стадіях — 10–12 мл. Асцит використовували для подальшого дослідження пухлинних клітин. На рис. 8–10 подано типові характеристики зміни маси тіла мишей-пухлиноносіїв у контролі (без введення препаратів, за щоденного введення фізіологічного розчину) і за щоденного введення досліджуваних препаратів (доксорубіцин у вільному та іммобілізованому на носієві стані). Як видно з даних, наведених

на рис. 8, у разі введення мишам-пухлиноносіям фізіологічного розчину тварини гинуть через 25–30 днів після прищеплення їм лімфому NK/Ly.

Лікування мишей з лімфомою NK/Ly доксорубіцином мало терапевтичний ефект, який залежав від дози цього протипухлинного препарату. Встановлено, що введення доксорубіцину в дозі 0,1 мг/кг маси тіла сприяло зростанню тривалості життя тварин до 40–45 днів, однак їхня маса тіла і далі збільшувалась, і миші гинули внаслідок хвороби (рис. 9, А). Водночас введення доксорубіцину у дозі 1 мг/кг маси тіла припинило ріст пухлини вже після перших ін'єкцій цього препарату.

Після такого введення препарату миші, яким було прищеплено лімфому NK/Ly, практично повністю виживалися (наростання асциту припинялося) і залишалися живими протягом щонайменше трьох місяців спостереження за ними. Разом з тим спостерігали наслідки токсичного впливу доксорубіцину на організм таких мишей, що виявлялись у вигляді певного зниження маси тіла наприкінці введення препарату порівняно з початковою масою тварин (рис. 9, Б).

Уведення мишам-пухлиноносіям доксорубіцину, іммобілізованого на олігомерному носієві у концентраціях 0,1 та 1 мг на 1 кг маси тіла тварин, мало ефект, подібний до досягнутого за введення доксорубіцину у концентрації 1 мг/кг маси тіла. Миші не набирали маси тіла (не наростав асцит) і залишалися живими протягом тривалого часу (більше 3 місяців) (рис. 10).

Ріст пухлини NK/Ly у миші

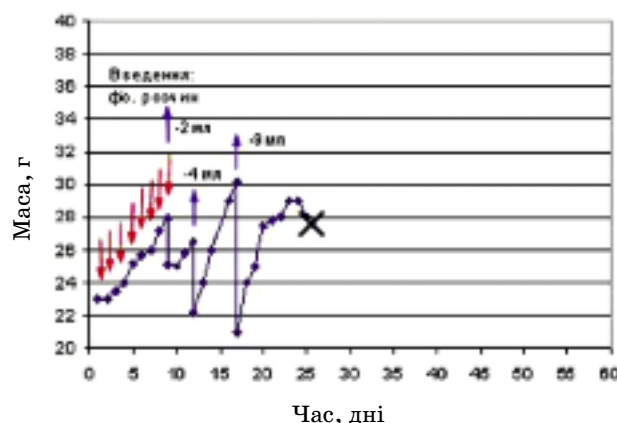


Рис. 8. Динаміка маси тіла мишей (типичний дослід) із прищепленою лімфомою NK/Ly (показник росту пухлини) в контролі (щоденне введення фізіологічного розчину, 0,5 мл):

червоними стрілками позначено час введення препарату, синіми — час дренажу. Хрестик означає загибель тварини.

Кількість досліджуваних мишей-пухлиноносіїв становила 10

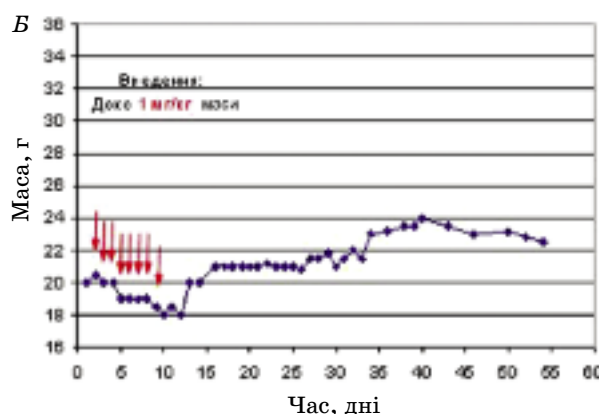
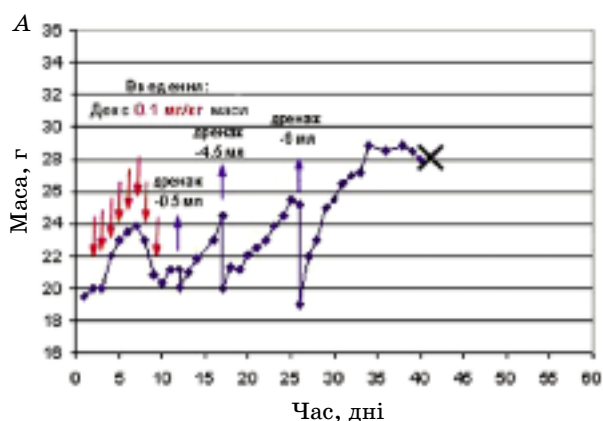
Слід зазначити, що за такого введення препарату також не спостерігали зниження маси тіла наприкінці процедури внаслідок токсичної дії доксорубіцину.

Про вищу ефективність дії доксорубіцину, іммобілізованого на новому олігомерному носії порівняно з дією вільного доксорубіцину щодо лімфомних клітин NK/Ly свідчать також результати деструктивних змін у цих клітинах, які вивчали за допомогою флуоресцентних барвників.

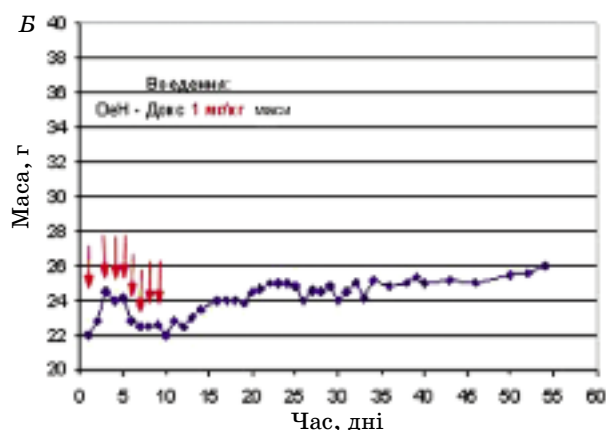
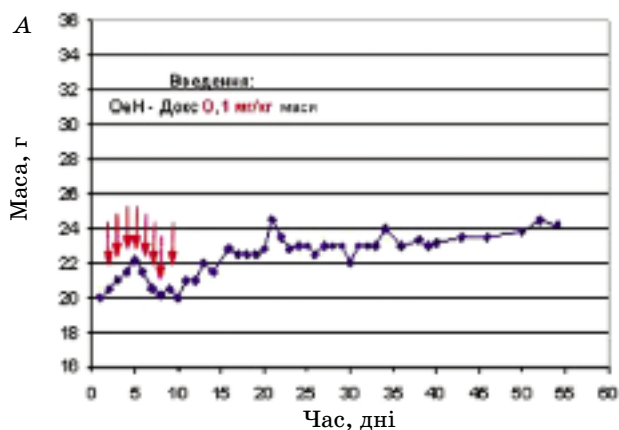
Як видно з рис. 11, в асциті мишей-пухлиноносіїв після введення іммобілізованого

доксорубіцину є значно більше ушкоджених лімфомних клітин (червоне свічення внаслідок накопичення в клітинах пропідію йодиду). Отже, здійснене нами введення препарату мишам з лімфомою NK/Ly за допомогою іммобілізованого доксорубіцину спричинює більш ефективно відмирання пухлинних клітин, ніж за умов введення тваринам вільного доксорубіцину в такій самій дозі.

Таким чином, проведені дослідження показали, що застосування олігомерного нанорозмірного носія ВА-МАНГ-МП для



**Рис. 9.** Динаміка маси тіла мишей (типовий дослід) із прищепленою лімфомою NK/Ly (показник росту пухлини) в контролі за умов щоденного введення доксорубіцину: у концентрації 0,1 мг/кг маси тіла (А) та доксорубіцину в концентрації 1 мг/кг маси тіла (Б). Червоними стрілками позначено час введення препарату, синіми — час дренажу. Хрестик означає загибель тварини. Кількість досліджених мишей-пухлиноносіїв становила 10



**Рис. 10.** Динаміка маси тіла мишей (типовий дослід) із прищепленою лімфомою NK/Ly (показник росту пухлини): в контролі за умов щоденного введення доксорубіцину, іммобілізованого на ОеН у концентрації 0,1 мг/кг маси тіла (А) та доксорубіцину, іммобілізованого на олігомерному наноносії (ОеН-Докс) у концентрації 1 мг/кг маси тіла (Б). Червоними стрілками позначено час введення препарату, синіми — час дренажу. Кількість досліджених мишей-пухлиноносіїв становила 10

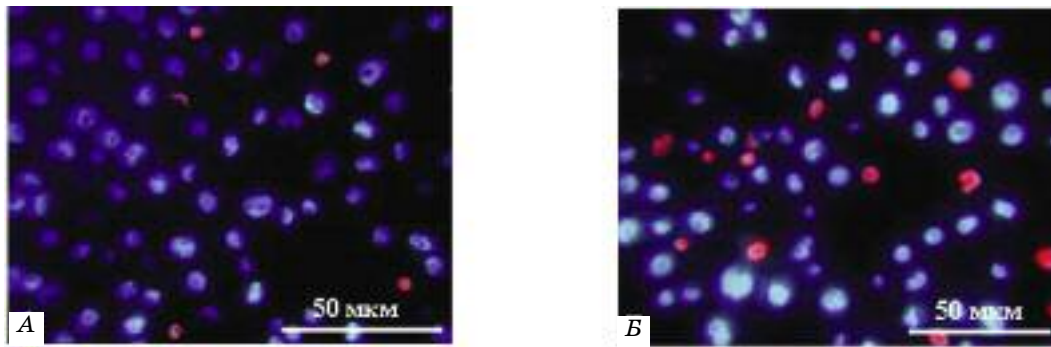


Рис 11. Клітини лімфоми мишей NK/Ly, одержані від тварин-пухлиноносіїв після хіміотерапії (5 ін'єкцій) із використанням:

вільного доксорубіцину (А, 0,1 мг/кг) і доксорубіцину (0,1 мг/кг), іммобілізованого на олігомерному нанорозмірному носіїві (Б).

Комбіноване фарбування ядер клітин флуоресцентним барвником Hoechst (сине свічення) і накопичення пропідію йодиду в ушкоджених клітинах (червоне свічення)

доставлення доксорубіцину в клітини пухлин дає змогу не лише *in vitro*, але й *in vivo* знизити лікувальну дозу цього препарату щонайменше у 10 разів зі збереженням протипухлинного ефекту. Ці результати є важливими для забезпечення зниження виявів негативних побічних ефектів, характерних як для доксорубіцину, так і для багатьох інших протипухлинних препаратів, які застосовують у хіміотерапії пухлин різної етіології.

Автори роботи вдячні за підтримку Західноукраїнського біомедичного дослідницького центру (WUBMRC, 2010–2011 роки).

## ЛІТЕРАТУРА

1. Caruthers S. D., Wickline S. A., Lanza G. M., Nanotechnological applications in medicine. // Curr. Opin. Biotechnol. — 2007. — V. 18. — P. 26–30.
2. Clavinas H., Crajcsi P., Cserepes J., Sarcadi B. The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity // Curr. Drug Deliv. — 2004. — V. 1. — P. 27–42.
3. Jäger E., Jäger A., Chytil P. et al. Combination chemotherapy using core-shell nanoparticles through the self-assembly of HPMA-based copolymers and degradable polyester // J. Contr. Rel. — 2012. — V. 3659, N 12. — P. 00805-X.
4. Wang T., Deepa B., Fagbohun O. A. et al. Enhanced binding and killing of target tumor cells by drug-loaded liposomes modified with tumor-specific phage fusion coat protein // Nanomedicine (Lond) . — 2010. — V. 5, N 4. — P. 563–574.
5. Zhang F., Zhu L., Liu G. et al. Imaging of Tumor Response to Doxil // Theranostics. — 2011. — V. 1. — P. 302–309.
6. Euliss L. E., DuPont J. A., Gratton S., DeSimone J. Imparting size, shape, and composition control of materials for nanomedicine // Chem. Soc. Rev. — 2006. — V. 35, N. 11. — P. 1095–2004.
7. Сопін Є. Ф., Виноградова П. П. Основи біохімічних методів дослідження. — К.: Вища школа. — 1975. — 244 с.
8. Lu Ch., Zhu F., Cho Y.-Y. et al. Cell Apoptosis: Requirement of H2AX in DNA Ladder Formation but not for the Activation of Caspase-3 // Mol. Cell. — 2006. — V. 23, N 1. — P. 121–132.
9. Singh N. D., Sharma A. K., P. et al. Patil Studies on Apoptotic Changes in Combined Toxicity of Citrinin and Endosulfan in Pregnant Wistar Rats and Their Fetuses // Toxicol. Int. — 2012. — V. 19, N. 2. — P. 138–143.
10. Savic R., Luo L. B., Eisenberg A., Maysinger D. Nanocontainers distribute to defined cytoplasmic organelles // Science. 2003. — V. 300. — P. 615–618.
11. Landowski T., Gleason-Gurman M., Dalton W. // Blood. — 1997. — V. 6. — P. 1854–1861.
12. Kahizuka A., Miller W., Umesono K. et al. // Cell. — 1991. — V. 66. — P. 663–667.

**ДЕЙСТВИЕ ДОКСОРУБИЦИНА,  
ДОСТАВЛЕННОГО В ОПУХОЛЕВЫЕ  
КЛЕТКИ *in vitro* И *in vivo*  
НОВЫМ НАНОРАЗМЕРНЫМ  
ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫМ  
ОЛИГОЭЛЕКТРОЛИТНЫМ НОСИТЕЛЕМ**

Н. Н. Бойко<sup>1</sup>, Ю. В. Сенькив<sup>1,3</sup>,  
Е. А. Шляхтина<sup>1,3</sup>, О. Ю. Ключивская<sup>1</sup>,  
Н. Р. Скороход<sup>1</sup>, Н. Е. Митина<sup>2</sup>,  
Т. В. Скорохода<sup>2</sup>, М. М. Москвин<sup>2</sup>,  
А. С. Заиченко<sup>2</sup>, Р. С. Стойка<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии клетки НАН Украины,  
Львов, Украина

<sup>2</sup>Национальный университет «Львовская  
политехника», Украина

<sup>3</sup>Львовский национальный университет  
им. Ивана Франко, Украина

*E-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua*

Одной из главных задач современной биофармацевтики является разработка новых наноразмерных носителей с низкой токсичностью, заданным размером, регулируемым откликом на локальные и удаленные воздействия, возможностями визуализации действия лекарств и результатов диагностики. В работе использован новый олигомерный носитель ВА-МАНГ-МП для доставки противоопухолевого препарата доксорубицина в опухолевые клетки различных линий. Синтезированный олигомерный носитель был дополнительно функционализирован фосфатидилхолином. Показано, что такая доставка доксорубицина в клетки-мишени позволяет снизить его действующую цитотоксическую дозу в 10 раз по сравнению с дозой свободного доксорубицина при сохранении одинакового по уровню антинеопластического эффекта. Этот дозовый эффект был продемонстрирован как *in vitro* на различных опухолевых клетках млекопитающих, так и *in vivo* на мышцах с экспериментальной лимфомой НК/Лу. Действие иммобилизованного доксорубицина сопровождалось более интенсивным, чем при действии свободного доксорубицина, образованием везикул на поверхности клеток-мишеней *in vitro* и межнуклеосомной фрагментацией их ДНК, а также более высокой долей мертвых клеток в асцитной жидкости мышей с лимфомой НК/Лу после введения препарата. Таким образом, синтезированный наноразмерный носитель на основе олигоэлектролитов является перспективной системой для доставки противоопухолевых препаратов в клетки-мишени.

**Ключевые слова:** доставка доксорубицина, опухолевые клетки, олигоэлектролиты, наноразмерные частицы.

**ACTION OF DOXORUBICIN DELIVERED  
TO TUMOR CELLS *in vitro* AND *in vivo*  
BY NOVEL NANOSCALE  
OLIGOELECTROLYTIC CARRIER**

N. M. Boiko<sup>1</sup>, Yu. V. Senkiv<sup>1,3</sup>,  
Ye. A. Shlyakhtina<sup>1,3</sup>, O. V. Kluchivska<sup>1</sup>,  
N. P. Skorohid<sup>1</sup>, N. E. Mitina<sup>2</sup>,  
T. V. Skorohoda<sup>2</sup>, M. M. Moskvina<sup>2</sup>,  
O. S. Zaichenko<sup>2</sup>, R. S. Stoika<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Cell Biology of National Academy  
of Sciences of Ukraine, Lviv

<sup>2</sup>National University «Lviv Polytechnics»,  
Ukraine

<sup>3</sup>Lviv National Ivan Franko University, Faculty  
of Biology, Ukraine

*E-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua*

The main tasks of modern biopharmaceutics are focused at the development of new nanoscale carriers with low toxicity, given size, regulated response to local and remote effects, and capability of visualization of drug action and diagnostic results. A novel oligomeric carrier VAMANG-MP for delivery of the anticancer drug doxorubicin to tumor cells of different lines have been used. The synthesized oligomeric carrier was additionally functionalized by phosphatidylcholine. It was demonstrated that such delivery of doxorubicin to the target cells permits 10 times decreasing of its acting cytotoxic dose comparing with such dose of free doxorubicin, with preserving similar level of the antineoplastic effect. This dose-specific effect was demonstrated both *in vitro* towards various mammalian tumor cells, and *in vivo* towards mice with experimental NK/Ly lymphoma was shown. Action of immobilized doxorubicin was followed by more intense formation of vesicles on a surface of the target cells *in vitro*, and by their inter-nucleosomal DNA fragmentation as compared to action of free doxorubicin, as well as by appearance of higher amount of dead cells in ascitic fluid of the treated NK/Ly lymphoma mice. Thus, the synthesized nanoscale oligoelectrolytic carrier is a perspective system for delivery of anticancer drugs to target cells.

**Key words:** doxorubicin delivery, tumor cells, oligoelectrolytes, nanoscale particles.



УДК 57.085.2

# СВОЙСТВА ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК НЕРВНОЙ ТКАНИ НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС В КУЛЬТУРЕ

А. Н. Сукач<sup>1,2</sup>  
Т. Д. Ляшенко<sup>2</sup>  
М. В. Шевченко<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,  
Харьков

<sup>2</sup>Харьковский национальный педагогический университет  
им. Г. С. Сковороды, Украина

E-mail: an\_sukach@yahoo.co.uk

Получено 10.10.2012

Показано, что изолированные клетки мозга новорожденных крыс являются гетерогенной суспензией, в состав которой наряду с окончательно дифференцированными входят стволовые и прогениторные клетки, способные пролиферировать и дифференцироваться в условиях культивирования *in vitro*. В процессе культивирования в присутствии сыворотки крови нервные клетки новорожденных крыс формируют агрегаты, в которых воссоздается утраченное при их выделении клеточное микроокружение и происходит восстановление клеток. После прикрепления к подложке клетки агрегатов мигрируют и распластаются, формируя монослой астроглии, на котором образуются нейробласты и колонии стволовых/прогениторных клеток. Полученные данные указывают на то, что культуру нервных клеток новорожденных крыс можно использовать в качестве модели постнатальной нервной ткани для исследования влияния клеточного окружения на процессы развития и восстановления дифференцированных нервных клеток, а также на пролиферацию и дифференциацию стволовых/прогениторных клеток.

**Ключевые слова:** дифференцированные нервные клетки, нервные стволовые/прогениторные клетки, новорожденные крысы, жизнеспособность, выживание, культивирование, многоклеточные агрегаты.

Исследование нервных стволовых/прогениторных клеток человека и животных имеет большое значение для выяснения особенностей развития нервной системы и возникновения нейродегенеративных заболеваний, а также разработки новых терапевтических подходов для их лечения. В настоящее время развитие нервной системы человека и животных в процессе эмбриогенеза достаточно хорошо изучено. При этом поведение нервных предшественников в процессе нейро- и глиогенеза в постнатальном и взрослом мозге во многом остается не изученным. Не вполне объяснимо также влияние клеточного микроокружения на пролиферацию и дифференциацию нервных стволовых/прогениторных клеток в постнатальном мозге. В качестве модели для изучения постнатального нейрогенеза, глиогенеза и их взаимосвязи, развития апоптоза клеток, возможного нейрогенного репарационного ответа клеток мозга при различных повреждениях мозга, механизмов нервного дифференцирования, экспрессии генов, а также влияния сигналов микроокруже-

ния, регулирующих фенотипическую специализацию в нервных тканях млекопитающих, могут быть использованы культуры клеток, изолированных из нервных тканей новорожденных лабораторных животных. В связи с этим актуальной является разработка способов получения нервных клеток новорожденных крыс, их характеристика и выяснение особенностей поведения в культуре *in vitro*.

## Материалы и методы

Нервные клетки (НК) выделяли из тканей головного мозга новорожденных крыс. Для этого ткань, предварительно измельченную ножницами, инкубировали 5 мин в 0,5% -м растворе трипсина при 37 °С, затем механически дезагрегировали на единичные клетки с использованием вибрации [1]. Полученную суспензию фильтровали через нейлоновый фильтр, после чего отмывали от трипсина центрифугированием при 1500 об/мин. Жизнеспособность клеток оценивали по окрашиванию витальным красителем

трипановым синим (0,4%; Sigma, США) и выражали в процентах [2]. Подсчет количества клеток проводили в камере Горяева, размер НК определяли при помощи программы Axio Vision.

Клетки культивировали в 24-луночных планшетах (Corning, США) в среде DMEM/F12 (Sigma), обогащенной 0,6% глюкозы, 2 мМ глутамин, 3 мМ бикарбоната натрия. В среду добавляли 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Культивирование проводили в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>, 95% воздуха. Половину объема среды культивирования заменяли на свежую порцию каждые 4–5 суток.

Иммуноцитохимические исследования клеточных культур осуществляли после их предварительной фиксации в растворе 4%-го параформальдегида. Фиксированные клетки пермеабилizировали абсолютным спиртом, блокировали 5%-й сывороткой козы (Sigma) и инкубировали с первичными антителами в течение ночи при +4 °С. Затем клетки промывали и культивировали с вторичными антителами 40 мин. В качестве первичных антител были использованы  $\beta$ -Tubulin III (mouse, Sigma), GFAP (mouse, Abcam, Великобритания), Nestin (mouse, Abcam), Vimentin (rabbit, Abcam). Вторичными антителами служили IgG, конъюгированный с FITC (Sigma, США), Chromeo 546 (Abcam) и Chromeo 488 (Abcam). Ядра клеток окрашивали красителем Hoechst 33342 (Sigma).

Микрофотосъемку культур клеток производили на микроскопе Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия).

Результаты обрабатывали статистически по методу Стьюдента с использованием программы MS Excel.

Эксперименты были проведены в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными III конгрессом по биоэтике (Киев, 20.09.07) и согласованными с положением Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1985).

### Результаты и обсуждение

Жизнеспособность свежесекретированных клеток мозга новорожденных крыс, определенная по окрашиванию витальным красителем трипановым синим, составляла в среднем 20–70%.

Полученные клетки были округлой формы с четко очерченной мембраной. Размер их колебался от 6 до 16 мкм (рис. 1, А).

Свежесекретированные НК высевали в концентрации 1, 2, 4, 6 и 8 млн/мл в 24-луночные планшеты и культивировали в среде DMEM/F12 в присутствии и при отсутствии 10%-й сыворотки крови крыс. В присутствии сыворотки уже в первые часы культивирования наблюдалось формирование плавающих многоклеточных агрегатов (рис. 1, Б), количество, структура и размеры которых зависели от концентрации и жизнеспособности высеванных клеток. В случае культивирования НК в концентрации 1 млн/мл формировалось небольшое количество мелких агрегатов. Культивирование клеток в концентрациях 6 и 8 млн/мл сопровождалось образованием агрегатов большого размера, которые активно сливались друг с другом. При этом плотность суспензии агрегатов была очень высокой, что затрудняло наблюдение за ними. Происходило также быстрое закисление среды культивирования. При культивировании НК в концентрации 2 и 4 млн/мл наблюдалось образование агрегатов, размер которых составлял в среднем 100 мкм (рис. 1, Б). Как правило, сформированные агрегаты имели неправильную форму и рыхлую структуру — клетки в них были упакованы неплотно (рис. 1, Б). При культивировании плавающих агрегатов, образованных клетками с жизнеспособностью выше 20% на протяжении 1–2 сут, упаковка клеток в них становилась более плотной, и они превращались в сфероиды (рис. 1, В). Количество образовавшихся сфероидов зависело прямо

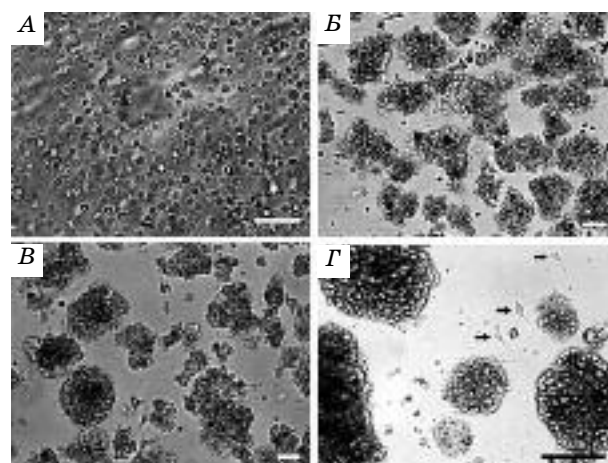


Рис. 1. Фазово-контрастная микроскопия культуры свежесекретированных НК, высеянных в концентрации 2 млн/мл:

А — НК через 10 мин после посева; Б — формирование плавающих многоклеточных агрегатов; В — образование сфероидов; Г — единичные распластаные клетки с морфологией фибробластов (стрелки). Масштаб 50 мкм



пропорціонально від вихідної життєспроможності висейнаних кліток. Якщо життєспроможність НК була нижче 10%, формувалося небагато кількості малих, рихлих агрегатів, які в процесі дальшого культивування не формували сфероїдів і не прикріплялися до підложки. При цьому єдиничні плаваючі клітки, не об'єднувавшись в агрегати, також не прикріплялися до підложки і при дальшому культивуванні погибали.

В процесі культивування НК в присутності сыворотки спостерігалося велике кількість єдиничних кліток, які не формували агрегатів. Деякі з цих кліток прикріплялися до підложки і розпластувалися (рис. 1, Г). Морфологічно вони були схожі на астроцити.

При відсутності в середі культивування сыворотки крові НК, як правило, не формували агрегатів, не прикріплялися до підложки і, в кінцевому підсумку, погибали.

Для вивчення впливу формуваних агрегатів на життєспроможність НК і їх поведінку в культурі використовували клітки з вихідною життєспроможністю  $56,2 \pm 4,2\%$  ( $n = 5$ ), які висівали в концентрації 4 млн/мл. В процесі культивування близько 80% висейнаних кліток формували агрегати. Через сутки культивування життєспроможність кліток в складі агрегатів збільшувалася в 1,5 рази і становила  $87 \pm 5,4\%$  ( $n = 5$ ). Частина агрегатів НК вже в перші сутки культивування прикріплювалася до підложки. При цьому прикріплення агрегатів значно активізувалося в разі заміни 2/3 частини середі або після їх пересіву. Схожо на прикріплення клітки агрегатів формували велику кількість довгих  $\beta$ -tubulin III-позитивних відростків (рис. 2, А). Цими відростками агрегати з'єднувалися між собою і по ним мігрували недифференційовані клітки (рис. 2, В).

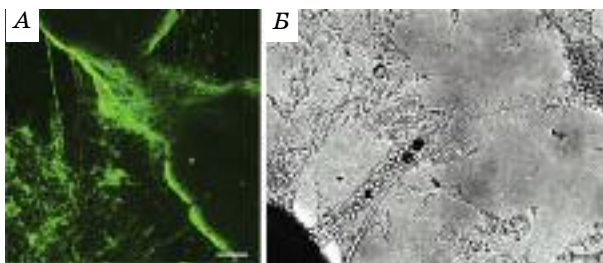


Рис. 2. Імуноцитохімічне фарбування антитілами на  $\beta$ -тубулін III кліток прикріпленого агрегата (А), по відросткам яких мігрують недифференційовані клітки (В): масштаб: А — 100 мкм, В — 50 мкм

Мігруючі від агрегатів клітки розпластувалися і утворювали ділянки моношару. На 4–6-е сут культивування на поверхні лунки формувалися обширні ділянки моношару кліток (рис. 3, А), на яких спостерігалося велике кількість  $\beta$ -тубулін III-позитивних кліток з морфологією нейронів (рис. 3, Б). Як правило,  $\beta$ -тубулін III-позитивні клітки локалізувалися в місцях прикріплення агрегатів до поверхні лунки (рис. 3, Б).

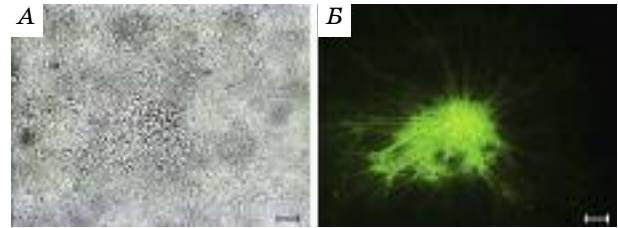


Рис. 3. Формування клітками прикріплених агрегатів моношару (А) і  $\beta$ -тубулін III-позитивних кліток з морфологією нейронів (Б): масштаб 50 мкм

В процесі культивування кількість кліток з морфологією нейронів зменшувалося, з гліальною морфологією — збільшувалося. На 7–9-е сут культивування  $\beta$ -тубулін III-позитивні клітки з морфологією нейронів практично зникли, але в той же час на поверхні GFAP-позитивного гліального моношару (рис. 4) з'являлися  $\beta$ -тубулін III-позитивні клітки, морфологічно схожі на нейробласти (рис. 5).

Кількість нейробластоподібних кліток в процесі дальшого культивування збільшувалося. На 15-е сут культивування на моношарі кліток глії з'являлися колонії недифференційованих  $\beta$ -тубулін III-позитивних кліток (рис. 5), більшість з яких були нестин- і виментин-позитивними (рис. 6).

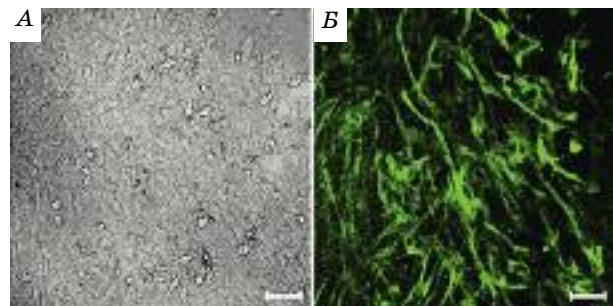
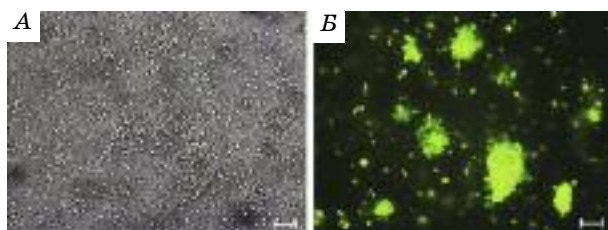
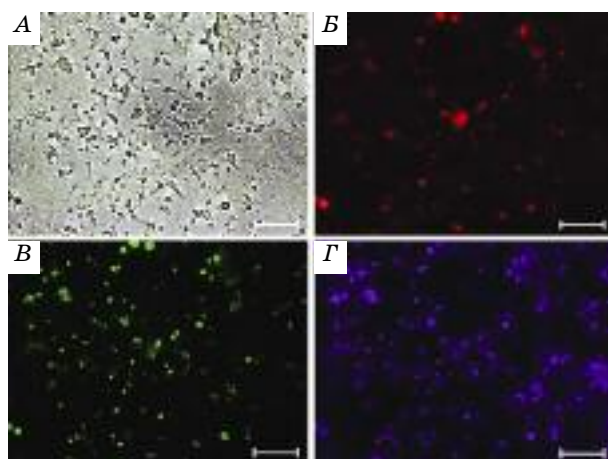


Рис. 4. Імуноцитохімічне фарбування кліток моношару (А), сформованого НК прикріплених агрегатів, на маркер астроцитів GFAP (glial fibrillary acidic protein) (Б): масштаб 50 мкм



**Рис. 5. Образование на монослое глии колоний и единичных нейробластоподобных  $\beta$ -тубулин III-положительных клеток:**

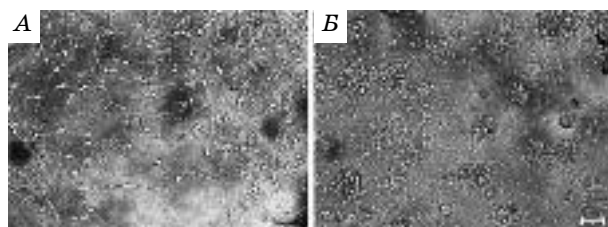
*A* — фазовый контраст; *B* — флуоресценция  $\beta$ -тубулин III. Масштаб 100 мкм



**Рис. 6. Иммуноцитохимическое окрашивание культуры свежевыделенных НК новорожденных крыс после 15 сут культивирования (*A*) на маркер нервных стволовых клеток нестин (*B*) и прогениторных — виментин (*B*):**

ядра клеток окрашены красителем Hoechst (*Г*). Масштаб 100 мкм

Нейробластоподобные клетки были способны формировать отростки, которые увеличивались в размерах и формировали клеточную сеть (рис. 7, *A*). Как следует из рис. 7, *A*, особенно активно процесс образования отростков нейробластоподобными клетками происходил на «голом» пластике. Колонии в процессе культивирования увеличивались в размерах и также формировали между собой контакты с помощью длинных отростков (рис. 7, *B*).



**Рис. 7. Формирование нейробластоподобными клетками сети (*A*) и образование контактов между растущими колониями нервных стволовых/прогениторных клеток (*B*):**

масштаб 50 мкм

Полученные результаты указывают на то, что изолированные из ткани мозга новорожденных крыс клетки представляют собой гетерогенную суспензию, состоящую из нейрональных и глиальных предшественников, а также окончательно дифференцированных и стволовых/прогениторных нервных клеток.

Проведенные исследования показали, что важным свойством свежееизолированных НК новорожденных крыс является формирование ими в процессе культивирования в присутствии сыворотки крови многоклеточных агрегатов.

Почему образуются агрегаты и какова их роль? В процессе выделения у клеток, с одной стороны, могут возникать микроповреждения, а с другой — может происходить потеря молекул адгезии (интегринов и е-кадгерина), что не позволяет клеткам эффективно прикрепляться к подложке при культивировании. Оставшихся молекул адгезии, вероятно, достаточно для образования межклеточных связей, и клетки, стремясь воссоздать утерянное при их выделении клеточное микроокружение, формируют агрегаты. При культивировании в агрегатах может формироваться внеклеточный матрикс, который необходим для обеспечения сигналов выживания изолированных клеток и предотвращает их апоптоз [3–6]. Наряду с этим в процессе культивирования агрегатов, с одной стороны, происходит репарация микроповреждений клеток, на что указывает увеличение их жизнеспособности, а с другой — в НК подобно гепатосферам [7] может происходить накопление е-кадгерина, что является главной причиной морфологического перехода от рыхлого клеточного агрегата к компактному сфероиду.

Таким образом, в процессе культивирования агрегатов происходит репарация микроповреждений клеток и, возможно, восстанавливаются утерянные молекулы адгезии, что позволяет агрегатам прикрепляться к подложке, а их составляющим клеткам мигрировать и расплываться.

Очевидно, в агрегатах создаются условия для поддержания жизнеспособности нейронов, клеток глии, а также стволовых/прогениторных клеток, что требует присутствия различных известных или неизвестных, растворимых либо мембранно-связанных факторов роста [8]. На это указывают результаты краткосрочного культивирования агрегатов, в процессе которого вначале наблюдается образование нейронов и клеток астроглии, а затем на монослое, сформированном астроцитами, появляются нейробла-

сты и стволовые/прогениторные клетки. При этом нейробласты и колонии стоволовых/прогениторных клеток, как правило, образуются на подложке, сформированной клетками астроглии. Это свидетельствует о том, что клетки глии играют роль фидерного слоя для нервных стоволовых/прогениторных клеток, обеспечивая их интактным и функциональным внеклеточным матриксом и связанными с матриксом факторами, а также секретируют регуляторные протеиновые факторы, необходимые для выживания и экспансии. В связи с этим можно предположить, что в данной ситуации клетки глии выполняют функцию ниши для нервных стоволовых/прогениторных клеток. Это предположение подтверждается тем, что клетки нейросфер или индуцированных в нейрональном направлении эмбрионидных тел [9, 10] после прикрепления также вначале формируют подложку из нейромезенхимальных клеток, на которых позднее появляются нейробласты и нейроны.

Следует также отметить схожесть поведения клеток агрегатов и нейросфер. Как и нейросферы [11], большинство клеток поверхностного слоя агрегатов являются  $\beta$ -тубулин III-положительными. При этом после прикрепления агрегатов миграция этих клеток предшествует миграции глиальных клеток, что отдаленно напоминает ситуацию в эмбриональном мозге, где нейрогенез предшествует глиогенезу [12]. По отросткам, которые образуют  $\beta$ -тубулин III-положительные клетки, подобно отросткам клеток радиальной глии, происходит активная миграция недифференцированных клеток. Все это свидетельствует о существовании подобных механизмов функционирования гетерогенных нервных клеток, объединенных в агрегаты с нейросферами, образованными стволовыми клетками.

Проведенные исследования показали, что в процессе культивирования  $\beta$ -тубулин III-положительные клетки с морфологией нейронов, которые мигрировали от прикрепленных агрегатов сразу после их прикрепления к подложке, исчезали. Возмож-

но, из-за отсутствия соответствующего микроокружения в процессе первых суток культивирования они погибали.

Из представленных данных также следует, что не во всех случаях НК способны восстанавливать свои повреждения. Суспензии НК с низкой жизнеспособностью, очевидно, помимо значительных повреждений плазматической мембраны характеризуются низким количеством молекул адгезии. Поэтому эти клетки формируют агрегаты небольшого размера с очень рыхлой структурой упаковки. К подложке такие агрегаты не прикрепляются и в процессе дальнейшего культивирования деградируют.

Таким образом, НК, изолированные из ткани головного мозга новорожденных крыс представляют собой гетерогенную суспензию, в состав которой входят окончательно дифференцированные и стволовые/прогениторные клетки, способные пролиферировать и дифференцироваться в нейроны и клетки глии в условиях культивирования *in vitro*.

В процессе культивирования в присутствии сыворотки крови НК новорожденных крыс формируют агрегаты, структура которых зависит от жизнеспособности, а размер — от жизнеспособности и концентрации посеянных клеток.

Агрегаты выполняют роль микротканей, в которых происходит восстановление повреждений нервных клеток, а также создаются условия для их выживания и функционирования.

Агрегаты НК новорожденных крыс можно использовать в качестве 3-мерной модели постнатальной нервной ткани для исследования влияния клеточного окружения и сигналов микроокружения на процессы развития и восстановления дифференцированных нервных клеток, а также на пролиферацию и дифференциацию нервных стоволовых/прогениторных клеток.

Авторы выражают благодарность к. б. н. Коваленко И. Ф. и к. б. н. Холодному И. С. за помощь в проведении микрофотосъемки.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Petrenko A. Yu., Sukach A. N. Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration // *Anal. Biochem.* — 1991. — V. 194, N 2. — P. 326–329.
2. Seglen P. O. Preparation of isolated rat liver cells // *Meth. Cell Biol.* — 1976. V. 13. — P. 29–83.
3. Frisch S. M., Ruoslahti E. Integrins and anoikis // *Curr. Opin. Cell Biol.* — 1997. — V. 9, N 5. — P. 701–706.
4. Frisch S. M., Screaton R. A. Anoikis mechanisms // *Ibid.* — 2001. — V. 13, N 5. — P. 555–562.
5. Hanahan D., Weinberg R. A. The hallmarks of cancer // *Cell.* — 2000. — V. 100, N 2. — P. 57–70.



6. Grossmann J. Molecular mechanisms of «detachment-induced apoptosis-anoikis» // Apoptosis. — 2002. — V. 7, N 3. — P. 247–260.
7. Lin R. Z., Chou L. F., Chien C. C., Chang H. Y. Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: roles of E-cadherin and  $\beta$ 1-integrin // Cell Tissue Res. — 2006. — V. 324, N 3. — P. 411–422.
8. Zaheer A., Zhong W., Ue E. Y. et al. Expression of mRNAs of multiple growth factors and receptors by astrocytes and glioma cells: detection with reverse transcription-polymerase chain reaction // Cell. Mol. Neurobiol. — 1995. — V. 15, N 2. — P. 221–237.
9. Caldwell M. A., He X., Wilkie N. et al. Growth factors regulate the survival and fate of cells derived from human neurospheres // Nat. Biotechnol. — 2001. — V. 19, N 5. — P. 475–480.
10. Bain G., Kitchens D., Yao M. et al. ECS express neuronal properties *in vitro* // Dev. Biol. — 1995. — V. 168, N 2. — P. 342–357.
11. Suslov O. N., Kukekov V. G., Ignatova T. N., Steindler D. A. Neural stem cell heterogeneity demonstrated by molecular phenotyping of clonal neurospheres // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2002. — V. 99, N 22. — P. 14506–14511.
12. Qian X., Shen Q., Goderie S. K. et al. Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells // Neuron. — 2000. — V. 28, N 1. — P. 69–80.

### ВЛАСТИВОСТІ ІЗОЛЬОВАНИХ КЛІТИН НЕРВОВОЇ ТКАНИНИ НОВОНАРОДЖЕНИХ ЩУРІВ У КУЛЬТУРИ

О. М. Сукач<sup>1,2</sup>  
Т. Д. Ляшенко<sup>2</sup>  
М. В. Шевченко<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Інститут проблем кріобіології і кріомедицини  
НАН України, Харків

<sup>2</sup>Харківський національний педагогічний  
університет ім. Г. С. Сковороди, Україна

E-mail: an\_sukach@yahoo.co.uk

Показано, що ізольовані клітини мозку новонароджених щурів є гетерогенною суспензією, до складу якої крім остаточно диференційованих входять стовбурові та прогеніторні клітини, здатні проліферувати та диференціюватися в умовах культивування *in vitro*. У процесі культивування в присутності сироватки крові нервові клітини новонароджених щурів формують агрегати, в яких відтворюється втрачене в процесі їх виділення клітинне мікрооточення і відбувається відновлення клітин. Після прикріплення до підкладки клітини агрегатів мігрують і розпластуються, формуючи моношар астроглії, на якому утворюються нейробласти та колонії стовбурових/прогеніторних клітин. Одержані дані вказують на те, що культуру нервових клітин новонароджених щурів можна використовувати як модель постнатальної нервової тканини для дослідження впливу клітинного оточення на процеси розвитку й відновлення диференційованих нервових клітин, а також на проліферацію і диференціацію стовбурових/прогеніторних клітин.

**Ключові слова:** диференційовані нервові клітини, нервові стовбурові/прогеніторні клітини, новонароджені щури, життєздатність, виживання, культивування, багатоклітинні агрегати.

### PROPERTIES OF ISOLATED NEURAL CELLS FROM NEWBORN RAT IN TISSUE *in vitro*

A. N. Sukach<sup>1,2</sup>  
T. D. Liashenko<sup>2</sup>  
M. V. Shevchenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and  
Cryomedicine of National Academy of Sciences  
of Ukraine, Kharkiv

<sup>2</sup>Skovoroda National Pedagogical University,  
Kharkiv, Ukraine

E-mail: an\_sukach@yahoo.co.uk

It is shown that isolated brain cells of newborn rats are heterogeneous suspension consisted of differentiated cells, stem and progenitor cells, which can proliferate and differentiate in conditions of *in vitro* cultivation. During cultivation in presence of serum the neural cells of the newborn rats form aggregates, where reconstitution of cellular microenvironment lost in isolation takes place followed by cell reparation. After attachment to a substrate the aggregate cells migrate and spread, form a monolayer of astroglia, which the neuroblasts and colonies of stem/progenitor cells are formed on. The findings show feasible application of newborn rat neural cells as model of postnatal neural tissue for studying the influence of cellular environment on process of development and recovery of differentiated neural cells, as well as proliferation and differentiation of stem/progenitor cells.

**Key words:** differentiated nervous cells, nervous stem/progenitor cells, new-born rats, viability, survival, cultivation, multicellular aggregates.

УДК 547.963.1:543.9

## ОЧИЩЕННЯ І ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОГО МАНОЗОСПЕЦИФІЧНОГО ЛЕКТИНУ ІЗ ЦИБУЛИН ГІАЦИНТИКА ГОСТРОЛОПАТЕВОГО (*Hyacinthella acutiloba* K. Perss.)

В. О. Антонюк<sup>1,2</sup>Л. В. Панчак<sup>1,2</sup>М. О. Старикович<sup>1</sup>Х. С. Струтовська<sup>2</sup>Р. С. Стойка<sup>1</sup><sup>1</sup>Інститут біології клітини НАН України, Львів<sup>2</sup>Львівський національний медичний університет  
ім. Данила Галицького, Україна

E-mail: Antonyuk @meduniv.lviv.ua

Отримано 28.11.2012

Із цибулин гіацинтика гостролопатевого (*Hyacinthella acutiloba* K. Perss.) афінною хроматографією на дріжджовому манані та подальшою іонообмінною хроматографією на DEAE-Toyorearl очищено новий лектин з виходом 6,5 мг/кг свіжої сировини. Найкращим інгібітором цього лектину серед випробуваних моно- і дисахаридів була D-тураноза (GlcP  $\alpha$ 1-3 FruF). Дуже сильним інгібітором активності лектину є дріжджовий манан. Слабкими інгібіторами були  $\alpha$ -метил-D-манопіранозид, D-фруктоза і 2-ацетамідо-D-галактопіранозид. Лектин також слабо взаємодіяв із глікогеном печінки свині, крохмалем і манозовмісними глікопротеїнами (ячний альбумін, овомукоїд та тиреоглобулін бика) і не взаємодіяв з пероксидазою хрому та лужною фосфатазою кишечника теляти.

За даними електрофорезу в 20%-му ПААГ із SDS, лектин складається із субодиниць з молекулярною масою 12 кДа. Його молекулярна маса, визначена гель-хроматографією на колонці Toyorearl HW-55, становила 48 кДа. Лектин найкраще аглютинуює еритроцити кролика, гірше — мурчака, дуже слабо — щура і не аглютинуює еритроцити людини та кози. Він не втрачає гемаглютинуючої активності після діалізу проти 1%-го розчину динатрієвої солі ЕДТА і витримує нагрівання при +65 °С протягом 1 години.

**Ключові слова:** манозоспецифічні лектини, гіацинтик гостролопатевої (*Hyacinthella acutiloba*), очищення, властивості.

Лектини — це протеїни або глікопротеїни неімуноної природи, які мають щонайменше один некаталітичний домен, який селективно і зворотно зв'язує моно- або олігосахариди, не спричинюючи при цьому їх хімічного перетворення. Лектини знайдено у рослин, грибів, тварин, мікроорганізмів і вірусів, де вони виконують різноманітні біологічні функції, що пов'язані з розпізнаванням вуглеводних детермінант на поверхні клітин. Результатом такого розпізнавання може бути розвиток інфекційного процесу, наприклад, проникнення часточок вірусу у клітини макроорганізму [1], симбіоз у мікоризних грибів [2] або стимуляція захисних реакцій організму під час захисту проти інфекції [3].

На сьогодні лектини є вагомими біотехнологічними інструментами і їх широко застосовують у біології, медицині та сільському господарстві.

Важливу групу становлять манозоспецифічні лектини однодольних рослин. Ці лектини, на відміну від манозоспецифічних лектинів дводольних рослин (зокрема, родини бобових), як правило, не зв'язують D-глюкозу та її похідні. Маючи високу селективність до манозильних ланцюгів у складі макромолекул, вони набули практичного застосування, оскільки такі структури відіграють важливу роль у багатьох біологічних процесах.

Базуючись на інсектицидній активності манозоспецифічних лектинів, вивели стійкі до шкідників трансгенні сільськогосподарські культури, які вже вирощують на великих площах. Трансгенні рослини рису із включеним геном лектину підсніжника мають значно вищу опірність до зеленої (*Nephotettix virescens*) та коричневої (*Nilaparvata lugens*) цикадок — найбільш злісних шкідників рису [4], а картопля



із цим самим геном має підвищену стійкість до рослинної тлі *Myzus persicae* /Sulz./ [5]. Лектини також застосовують для розділення різних типів клітин та клітинних субпопуляцій, мітогенної стимуляції лімфоцитів, гістохімічного виявлення патологічних клітин, ідентифікації груп крові та штамів мікроорганізмів, розділення глікопротеїнів і дослідження їх біосинтезу [6–8]. Інтерес становлять роботи співробітників Aethlon Medical Inc. (San Diego, Calif., США) щодо очищення крові людини від вірусу гепатиту С шляхом плазмаферезу через спеціальну колонку, наповнену іммобілізованим лектином підсніжника. Після 3-разових сеансів на тиждень через 2 тижні такого лікування рівень вірусу в крові пацієнтів знижувався в середньому на 57% [9, 10].

Лектини нарцису і підсніжника не реагують з  $\alpha$ 1-6-;  $\alpha$ 1-3-;  $\alpha$ 1-4-глюканами (лінійними, розгалуженими, природними і синтетичними). Водночас вони преципітують розгалужені  $\alpha$ -манани дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* із мнотинними бічними залишками D-манози, приєднаної до  $\alpha$ 1-6-манопіранозиду. Преципітація спостерігається також із лінійним  $\alpha$ -мананом дріжджів *Hansenula capsulata*. Галактоманани з бічними залишками  $\alpha$ -галактоманозилу або  $\alpha$ -манобіозилу, приєднані до  $\alpha$ -1-6-манопіранозиду основного ланцюга полісахариду з дріжджів *Candida lipolytica*, *Torulopsis lactiscondens*, *Torulopsis gropengisseri*, також виявляють високу спорідненість до цієї групи лектинів [11]. Її можна розділити на три підгрупи на основі реактивності цих лектинів до складних гліканних ланцюгів фетуїну, асіалофетуїну та фітогемаглютиніну-Е з *Phaseolus vulgaris* [12]. Завдяки цьому їх можна використовувати як ліганди афінних сорбентів для розділення глікопротеїнів та їх аналізу. Кожен лектин, навіть у межах однієї родини, має притаманну лише йому вуглеводну специфічність, тому пошук нових лектинів та дослідження їхніх властивостей триває.

У результаті пошуку лектинів серед рослин інших родин класу однодольних нами було знайдено нові лектини, зокрема у цибулинах гіацинтника гостролопатевого (*Hyacinthella acutiloba* K. Perss.) родини гіацинтових (*Hyacinthaceae*), яка належить до класу однодольних порядку спаржецвітих.

Метою цієї роботи було розроблення методу одержання лектину гіацинтника гостролопатевого і дослідження його властивостей.

## Матеріали і методи

Рослинну сировину заготовляли у вересні на приватній земельній ділянці у м. Львові. Підземну частину рослини відмивали від землі, подрібнювали і гомогенізували у співвідношенні 1:3 з 0,9%-м розчином NaCl. Одержаний гомогенат центрифугували при 6 000 g 10 хв. Надосадову рідину освітлювали, доводячи рН до 4,5. Після повернення рН до значень 6,5–7,0 протеїни надосадової рідини осаджували сульфатом амонію за 90%-го насичення останнього. Утворений осад збирали центрифугуванням, розчиняли у воді й після короточасного діалізу проти води наносили на афінний сорбент. Ним слугував співполімер дріжджового манану і крохмалю, спосіб одержання якого описано раніше [13]. Елюцію лектину з колонки афінного сорбента здійснювали за допомогою 2%-го розчину D-манози, розчиненої в 0,05 М калій-боратному буферному розчині, рН 8,2. Вихід протеїну з колонки контролювали за абсорбцією елюату при 280 нм. Фракції, що містили протеїн, об'єднували, висолювали сульфатом амонію за 90%-го насичення і діалізували проти 0,02 М фосфатного буферного розчину. Після діалізу розчин наносили на колонку DEAE-Toyorearl, попередньо врівноважену тим самим буферним розчином. Збирали фракції, які спричинювали аглютинацію еритроцитів кролика і виходили з колонки іонообмінника в діапазоні концентрацій буферного розчину 0,05–0,15 М, рН 7,0 (рис. 1).

Інші використані в роботі лектини (із м'якоті плодів банану, цибулин підсніжника та нарцису, зубків часнику, кореневих купини багатоквіткової) одержували за вищеприписаною методикою з незначними модифікаціями.

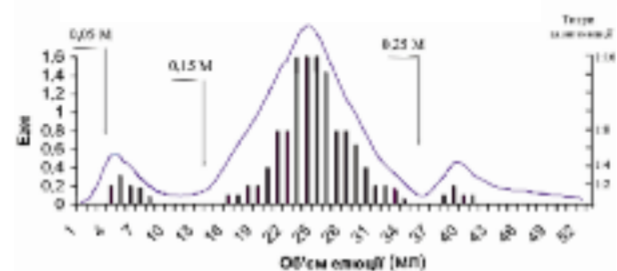


Рис. 1. Очищення лектину *Hyacinthella acutiloba* іонообмінною хроматографією: стрілками позначено місце нанесення зразка і молярність фосфатного буфера; стовпчиками показано місце виходу лектину за гемаглютинуючою активністю щодо еритроцитів кролика (шкала праворуч)

Молекулярну масу субодиниць лектину визначали за допомогою електрофорезу в 20%-му поліакриламідному гелі за присутності 0,1% додецилсульфату натрію (SDS). Як стандарт використовували суміш протеїнів з відомою молекулярною масою фірми Fermentas (Литва).

Молекулярну масу лектину визначали гелі-хроматографією на колонці Toyopearl HW-55, застосовуючи як маркери яєчний лізоцим ( $M_r = 14,3$ ), соєвий інгібітор трипсину ( $M_r = 21$  кДа), пероксидазу хрому ( $M_r = 43$  кДа), лектин насіння гороху ( $M_r = 48$  кДа), лектин підсніжника ( $M_r = 50$  кДа), альбумін сироватки крові бика ( $M_r = 69$  кДа) та лектин виноградного слимака ( $M_r = 79$  кДа).

Вміст вуглеводів у препараті лектину знаходили за методом Dubois et al. [14].

Вуглеводну специфічність одержаного лектину визначали в реакції пригнічення гемаглютинації еритроцитів кролика вуглеводами і глікопротеїнами. За допомогою ступінчастого розведення вуглеводу чи глікопротеїну встановлювали його мінімальну концентрацію, за якої повністю пригнічувалась активність лектину з титром 1:4 [15].

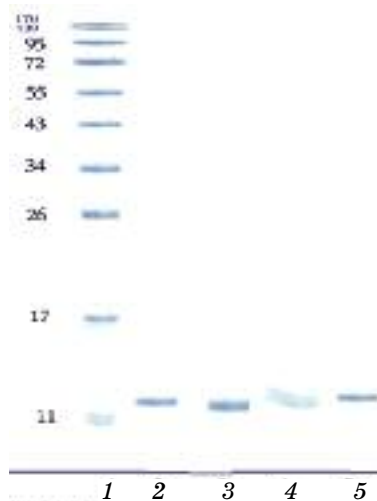
Для характеристики вуглеводної специфічності лектину використовували: D-глюкозу, D-фруктозу, D-галактозу, сахарозу, мальтозу, лактозу (Союзхимреактив), рафінозу (Fluka, Швейцарія),  $\alpha$ - і  $\beta$ -метил-D-галактозиди, L-рамнозу, 2-ацетамідо-D-галактопіранозид та 2-ацетамідо-D-глюкопіранозид (Chemapol, Чехія), D-манозу, D-туранозу, L-рибозу (виробництва Братиславського хімічного інституту), мелібіозу,  $\alpha$ -метил-D-манозид, L-фукозу (Koch Light, Великобританія). Вивчаючи взаємодію з глікопротеїнами та полісахаридами, застосовували водорозчинний крохмаль, глікоген печінки свині, овомукоїд та тричі перекристалізований овальбумін (Biolar, Олайн, Латвія), гуміарабік і гепарин (Loba Feinchemie, Австрія), лужну фосфатазу з кишечника теляти (Serva, Німеччина), очищали інулін [16], дріжджовий манан [17] /і тиреоглобулін бика [18].

### Результати та обговорення

З 1 кг свіжозібраних цибулин гіацинтика гостролопатевого (*Hyacinthella acutiloba*) було одержано 6,5 мг ліофільно висушеного лектину — білого аморфного порошку, добре розчинного у водно-сольових розчинах при рН 3–9. Лектин витримує прогрівання при +65 °С протягом 1 год, але за 15 хв при +75 °С його активність втрачалась на 75%. За діалізу проти 1%-го розчину динат-

рієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти упродовж 8 год лектин не втрачав гемаглютинуючої активності. Це свідчить про те, що іони  $Ca^{2+}$  і  $Mg^{2+}$  не є необхідними для вияву його активності. Найімовірніше, лектин є чистим протеїном, а не глікопротеїном, оскільки в складі одержаного препарату вуглеводів було виявлено менше 0,5%.

Під час електрофорезу в 20%-му ПААГ у присутності 0,1% SDS виявлено одну зону, яка відповідає молекулярній масі 12 кДа (рис. 2).



20% ПААГ, рН 8,6 з 0,1% ДДС-Na

1 — протеїни-маркери мол. маси; 2 — NPA; 3 — НАВА; 4 — АСА; 5 — GNA

Рис. 2. Електрофорез лектину *Hyacinthella acutiloba* та інших манозоспецифічних лектинів однодольних рослин у 20%-му ПААГ за присутності 0,1% SDS

За рН 7,2 лектин є гомотетрамером — його молекулярна маса, визначена гелі-хроматографією, становила 48 кДа.

Лектин найкраще аглютинує еритроцити кролика, значно слабше — еритроцити мурчака. Еритроцити щура аглютинують в дуже високій концентрації, а еритроцити людини та кози не аглютинують. За профілем взаємодії з еритроцитами кролика, мурчака і щура досліджуваний лектин відрізняється від інших манозоспецифічних лектинів однодольних (табл. 1). За вуглеводною специфічністю він є ближчим (але не ідентичним) до лектину часнику, ніж до інших лектинів, наведених у табл. 2.

Можна припустити, що достатньо сильна взаємодія лектину з D-туранозою (Glcр  $\alpha$ -1-3 Fgluf) пояснюється селективністю лектину до  $\alpha$ 1-3-зв'язків і відносною нерозбірливістю до глюко- чи манопіранозильного циклу або ж вирішальне значення для взаємодії

Таблиця 1. Взаємодія манозоспецифічних лектинів з еритроцитами людини і тварин

Лектин	Мінімальна концентрація лектину (мкг/мл), що спричинює аглютинацію еритроцитів				
	Кролик	Мурчак	Щур	Людина (групи O, A, B)	Коза
НАВА	19	625	2500	–	–
МВА	9,75	2,44	2500	–	–
NPA	9,75	19	312	–	–
GNA	9,75	312	–	–	–
LVA	4,88	9,75	625	–	–
PMRA	4,88	78	9,75	–	–
ASA	19	312	1250	–	–

*Примітка.* Прочерк означає відсутність аглютинації у концентрації 10 000 мкг/мл; **НАВА** — *Niacintella acutiloba bulb agglutinin*, лектин гіацинтика гостролопатевого; **МВА** — *Musa banana agglutinin*, лектин м'якоти плодів банана; **NPA** — *Narcissus pseudonarcissus agglutinin*, лектин цибулин нарциса; **GNA** — *Galanthus nivalis agglutinin*, лектин цибулин підсніжника; **LVA** — *Leucojum vernum agglutinin*, лектин цибулин білоцвіту весняного; **PMRA** — *Polygonatum multiflorum rhizomae agglutinin*, лектин кореневищ купини багатоквіткової; **ASA** — *Allium sativum agglutinin*, лектин зубків часнику.

Таблиця 2. Взаємодія лектинів з вуглеводами та глікопротеїнами

Інгібітор	Найменша концентрація (мМ або %), що пригнічує активність 4 гемаглютинуючих одиниць лектину				
	НАВА	ASA	МВА	PMRA	NPA
$\alpha$ -Метил-D-манопіранозид	50	50	50	–	–
D-фруктоза	100	–	100	–	–
Тураноза	6,25	50	25	25	100
2-Ацетамідо-D-галактопіранозид	50	–	100	12,5	12,5
Ячний альбумін	0,25%	–	0,125%	0,5%	–
Овомукоїд	0,25%	1%	0,125%	–	0,5%
Пероксидаза коренів хрону	–	0,5%	0,062%	–	–
Крохмаль	0,5%	–	0,5%	1%	–
Глікоген печінки свині	0,125%	–	–	–	–
Дріжджовий манан	0,0005%	0,008%	0,004%	0,002%	0,002%
Тиреоглобулін бика	0,125%	0,125%	0,5%	0,016%	0,25%
Лужна фосфатаза кишечника теляти	–	–	0,5%	1%	0,25%

*Примітка.* У таблицю не внесено D-глюкозу, D-галактозу, D-ксилозу, L-рамнозу, L-арабінозу, L-фукозу, лактозу, рафінозу, мелібіозу, 2-ацетамідо-D-глюкопіранозид, D-глюкуронову кислоту, гуміарабік, гепарин, ламінарин, інουλін, імуноглобулін G людини, з якими лектини не взаємодіяли у концентрації 100 мМ (моно- і дисахариди) або 1% (полісахариди і глікопротеїни).

глікокон'югату з лектином має довжина або кількість олігосахаридних «антен». Так, лектин слабо взаємодіє з глюкозовмісним крохмалем і сильніше — з глікогеном печінки свині, розгалуженість у якого вища. Не взаємодіє він із пероксидазою хрону, у якої маноза є термінальним вуглеводом олігосахаридної частини молекули, взаємодіє з тиреоглобуліном бика, ячним альбуміном та ово-

мукоїдом, де маноза лежить у корі олігосахаридних «антен». Ди- і тетраантенні олігосахаридні ланцюги лужної фосфатази довші за триантенні ланцюги тиреоглобуліну бика та ячного альбуміну. Це може мати вирішальне значення для взаємодії з лектином (структури олігосахаридних ланцюгів наведено в роботі [19]).

Для встановлення вуглеводної специфічності лектину потрібен великий набір олігосахаридів та глікопротеїнів з певною структурою, що є доступним для небагатьох лабораторій світу, тому в цій роботі зроблено лише перший крок у цьому напрямі.

Таким чином, уперше очищений нами лектин із цибулин гіацинтника гострорлопатевого відрізняється від раніше відомих манозспецифічних лектинів за своїм профілем взаємодії з олігосахаридними структурами.

Це становить значний інтерес для біотехнологічних досліджень, зокрема при створенні афінних сорбентів, які можуть набути застосування у розділенні глікокон'югатів, ефективно афінне очищення яких у багатьох випадках потребує застосування декількох афінних сорбентів з різними лігандами.

Автори висловлюють подяку с. н. с., к. б. н. Р. О. Білому за критичні зауваження під час підготовки рукопису.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Eisen S., Dzwonek A., Klein N. J. Mannose-binding lectin in HIV infection // *Future Virol.* — 2008. — V. 3, N 3. — P. 225–233.
2. Giollant M., Guillot J., Damez M. et al. Characterization of a lectin from *Lactarius deterrimus*. Research on the possible involvement of the fungal lectin in recognition between mushroom and spruce during the early stages of mycorrhize formation // *Plant. Physiol.* — 1993. — V. 101. — P. 513–522.
3. Willment J. A., Brown G. D. C-type lectin receptors in antifungal immunity // *Trends Microbiol.* — 2008. — V. 16, N 1. — P. 27–32.
4. Foissac X., Thi Loc N., Christou P. et al. Resistance to green leafhopper (*Nephotettix virescens*) and brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) in transgenic rice expressing snowdrop lectin (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA) // *J. Insect. Physiol.* — 2000. — V. 46, N 4. — P. 573–583.
5. Down R. E., Ford L., Woodhouse S. D. et al. Tritrophic interactions between transgenic potato expressing snowdrop lectin (GNA), an aphid pest (peach-potato aphid; *Myzus persicae* (Sulz.) and a beneficial predator (2-spot ladybird; *Adalia bipunctata* L.) // *Transg. Res.* — 2003. — V. 12, N 2. — P. 229–241.
6. Sharon N., Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules // *Glycobiology.* — 2004. — V. 14. — P. 53R–62R.
7. Антонюк В. О. Лектини та їх сировинні джерела. — Львів: Кварт, 2005 — 554 с.
8. Nascimento K. S., Cunha A. I., Nascimento K. S. et al. An overview of lectins purification strategies // *J. Mol. Recognit.* — 2012. — V. 25. — P. 527–541.
9. Tullis R. H., Duffin R. P., Handley H. H. et al. Reduction of hepatitis C virus using lectin affinity plasmapheresis in dialysis patients // *Blood Purif.* — 2009. — V. 27, N 1. — P. 64–69.
10. Tullis R. H., Duffin R. P., Ichim T. E. et al. Modeling Hepatitis C Virus Therapies Combining Drugs and Lectin Affinity Plasmapheresis // *Ibid.* — 2010. — V. 29. — P. 210–215.
11. Kaku H., van Damme E. I. M., Peumans W. J., Goldstein I. J. Carbohydrate-binding specificity of the daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*) and amaryllis (*Hippeastrum hybr.*) bulb lectins // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1990. — V. 279, N 2. — P. 298–304.
12. Barre A., van Damme E. J. M., Peumans W. J., Rouge P. Structure-Function Relationship of Monocot Mannose-Binding Lectins // *Plant Physiol.* — 1996. — V. 112. — P. 1531–1540.
13. Антонюк В. О. Спосіб очищення манозспецифічних лектинів / Деклараційний патент на корисну модель № 13770. Опубл. 17.04.2006, Заявка u200510008.
14. Dubois M., Gilles K., Hamilton I. et al. Colorimetric method for demonstration of sugars and related substances // *Anal. Chem.* — 1956. — V. 28, N 3. — P. 350–356.
15. Луцик М. Д., Панасюк Е. Н., Антонюк В. А. и др. Методы исследования углеводной специфичности лектинов (методические рекомендации). — Львов, 1983. — 20 с.
16. Лазурьевский Г. В., Терентьева И. В., Шамшури А. А. Практические работы по химии природных соединений. — М.: Высшая школа, 1966. — 336 с.
17. Методы химии углеводов / Под ред. Кочеткова Н. К. — М.: Мир, 1967. — 512 с.
18. Shifrin S., Consiglio E., Kohn L. D. Effect of the Complex Carbohydrate Moiety on the Structure of Thyroglobulin // *J. Biol. Chem.* — 1983. — V. 258, N 6. — P. 3780–3786.
19. Панчак Л. В., Антонюк В. А. Очистка лектина из плодовых тел *Lactarius pergamenus* (Fr.) Fr и изучение его свойств // *Биохимия.* — 2011. — Т. 76, № 4. — С. 537–550.



**ОЧИСТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА  
НОВОГО МАННОЗОСПЕЦИФИЧНОГО  
ЛЕКТИНА ИЗ ЛУКОВИЦ  
ГИАЦИНТИКА ОСТРОЛОПАСТНОГО  
(*Hyacinthella acutiloba* K. Perss.)**

*В. О. Антонюк*<sup>1,2</sup>  
*Л. В. Панчак*<sup>1,2</sup>  
*М. О. Старикович*<sup>1</sup>  
*Х. С. Струтовская*<sup>2</sup>  
*Р. С. Стойка*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии клетки НАН Украины,  
Львов

<sup>2</sup>Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого, Украина

*E-mail: Antonyuk @meduniv.lviv.ua*

Из луковиц гиацинтника остролопастного (*Hyacinthella acutiloba* K. Perss.) аффинной хроматографией на дрожжевом маннани и последующей ионообменной хроматографией на DEAE-Toyopearl очищен новый лектин с выходом 6,5 мг/кг свежего сырья. Наилучшим ингибитором лектина среди испытанных моно- и дисахаридов была D-тураноза (GlcP  $\alpha$ 1-3 FruF). Очень сильным ингибитором активности лектина является дрожжевой маннан. Слабыми ингибиторами активности были  $\alpha$ -метил-D-маннопиранозид, D-фруктоза и 2-ацетамидо-D-галактопиранозид. Лектин также слабо взаимодействовал с гликогеном печени свиньи, крахмалом и маннозосодержащими гликопротеинами (яичным альбумином, овомукоидом, тиреоглобулином быка) и не взаимодействовал с пероксидазой хрена и щелочной фосфатазой кишечника теленка.

По данным электрофореза в 20%-м ПААГ с SDS, лектин состоит из субъединиц молекулярной массой 12 кДа. Его молекулярная масса, определенная гель-хроматографией на колонке Toyopearl HW-55, составляла 48 кДа. Лучше всего лектин агглютинирует эритроциты кролика, хуже — морской свинки, очень слабо — крысы и не агглютинирует эритроциты человека и козы. Лектин не теряет гемагглютинирующей активности после диализа против 1%-го раствора динатриевой соли ЭДТА и выдерживает нагревание до +65 °C на протяжении 1 часа.

**Ключевые слова:** маннозоспецифичные лектины, гиацинтник остролопастной (*Hyacinthella acutiloba*), очистка, свойства.

**PURIFICATION AND CHARACTERIZATION  
OF A NEW MANNANOSE-SPECIFIC LECTIN  
FROM *Hyacinthella acutiloba* K. Perss.**

*V. O. Antonyuk*<sup>1,2</sup>  
*L. V. Panchak*<sup>1,2</sup>  
*M. O. Starykovych*<sup>1</sup>  
*K. S. Strutovskaya*<sup>2</sup>  
*R. S. Stoika*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Cell Biology  
of National Academy of Sciences of Ukraine,  
Lviv

<sup>2</sup>Danylo Halytsky Lviv National Medical  
University, Ukraine

*E-mail address: antonyuk@meduniv.lviv.ua*

A new lectin with 6.5 mg/kg yield was purified from fresh bulb *Hyacinthella acutiloba* K. Perss. by combination of affinity chromatography on yeast mannan and by ion exchange chromatography on DEAE-toyopearl. The best lectin inhibitor among tested mono- and disaccharides was D-turanose (GlcP  $\alpha$ 1-3 FruF). Very powerful inhibitor of lectin activity was yeast mannan. The lectin revealed weak affinity to  $\alpha$ -methyl-D-mannoside, D-fructose and 2-acetamido-D-galactopyranoside. The lectin interacted also with pig liver glycogen, starch and mannan-containing glycoproteins (ovoalbumin, ovomucoid and calf thyroglobulin), but don't interacted with horseradish peroxidase and calf intestine alkaline phosphatase.

According to electrophoresis, in 20% SDS-PAAG containing SDS-Na the lectin consists with subunits of molecular weight 12 kDa. Molecular weight of the lectin is 48 kDa according to gel-chromatography on Toyopearl HW-55. The lectin agglutinated best of all rabbit erythrocytes and worse agglutinated guinea-pig, very weak — rat erythrocytes and did not agglutinate human and goat erythrocytes. After dialysis against 1% EDTA sodium salt solution the lectin did not lose hemagglutinating activity and endured heating to +65 °C during one hour.

**Key words:** mannanose-specific lectins, *Hyacinthella acutiloba*, purification, properties.



УДК 633.12:631.5:582:581.1

# НАКОПИЧЕННЯ СПОЛУК ФЕНОЛЬНОЇ ПРИРОДИ В КУЛЬТУРІ ТРАНСФОРМОВАНИХ КОРЕНІВ РІЗНИХ ДЖЕРЕЛ ЕКСПЛАНТІВ ГРЕЧКИ ЗВИЧАЙНОЇ (*Fagopyrum esculentum* Moench)

О. В. Ситар<sup>1,2</sup>А. М. Габр<sup>2,3</sup>Н. Ю. Таран<sup>1</sup>І. М. Сметанська<sup>2,4</sup><sup>1</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна<sup>2</sup>Берлінський технічний університет, Німеччина<sup>3</sup>Національний дослідний центр, Каїр, Єгипет<sup>4</sup>Університет прикладних наук, Вайнцбах, Німеччина

E-mail: o\_sytar@ukr.net

Отримано 28.05.2012

Досліджували параметри росту культури трансформованих коренів, вміст загальних фенолів та особливості синтезу фенольних сполук у культурах трансформованих коренів, що їх було одержано з різних джерел експлантів гречки *Fagopyrum esculentum* за допомогою *Agrobacterium rhizogenes* штам А4. Використовували методи отримання трансформованої культури коренів та визначення загальних фенолів, газорідинної хроматографії, полімеразної ланцюгової реакції. Встановлено зростання вмісту загальних фенолів у трансформованих коренях гречки з різних джерел експлантів (корені, листки, стебла). У досліджуваних культурах ідентифіковано високий вміст хлорогенової, *p*-гідроксибензойної, *p*-анісової та кофейної кислот, що свідчить про можливість їх промислового одержання. Максимальний ріст культури трансформованих коренів дорівнював 21,2 г/л у культурі з коренями, 17,7 г/л — з листками та 14,6 г/л — зі стеблами на 3-й тиждень після перенесення. Вбудовування гена *rol B* до трансформованих коренів у рослин гречки за допомогою *Ri*-плазмід *Agrobacterium rhizogenes* було підтверджено за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

**Ключові слова:** *Fagopyrum esculentum* Moench, феноли, фенольні кислоти, *Agrobacterium rhizogenes*, культура трансформованих коренів.

Антиоксиданти відіграють важливу роль в захисті організму від дії оксидативного стресу, спричиненого вільними радикалами, які є активними молекулами, що містять один чи кілька неспарених електронів, а тому вони дуже нестійкі й ушкоджують інші молекули, вилучаючи з них електрони з метою досягнення стабілізації [1, 2]. На сьогодні в світі ведуть активний пошук джерел антиоксидантів рослинного походження, серед яких значне місце посідають сполуки фенольної природи.

Гречку звичайну (*Fagopyrum esculentum* Moench) визнано як харчовий і дієтичний продукт у багатьох країнах світу, оскільки вона містить, зокрема, багато фенолів [3], флавоноїдів, вітамін Е [4] та різні амінокислоти [5]. Рослини гречки мають вищий вміст загальних фенолів та більшу антиоксидантну активність порівняно з рослинами амаранту, пшениці й лободи [6]. Вони є найповнішим джерелом антиоксидантів серед зернових та псевдозернових культур [7, 8].

Основні фенольні речовини — це вторинні метаболіти: рутин, хлорогенова кислота та гіперозид, що характеризуються високою антиоксидантною активністю [9]. Накопичення хлорогенової кислоти, можливо, пов'язано із синтезом кверцетин-3-О-рутинозиду та ціанідин-3-галактозиду [10, 11]. Вміст рутину і кверцетину в гречці значною мірою залежить від умов культивування та сорту [12, 13]. Загалом рівень рутину та кверцетину в гречаній крупі становить близько 0,20 мг/г та 0,001 мг/г, відповідно. Вегетативна маса гречки містить більше рутину (0,84–4,41 мг/г) та кверцетину (0,009–0,029 мг/г) [13]. Гречка татарська є оптимальним джерелом рутину, оскільки її крупа має рівень рутину 80,94 мг/г. Крім рутину та кверцетину, в екстрактах гречаної крупы (*F. esculentum* Moench) було ідентифіковано чотири катехіни з високою антиоксидантною активністю: епікатехін, катехін 7-О- $\beta$ -D-глюкопіранозид, епікатехін 3-О-*p*-гідроксибензоат та епікатехін 3-О-(3,4-ди-О-

метил)-галат. Вони характеризуються вищою порівняно з рутином антиоксидантною активністю [14, 15]. Поряд із цим на сьогодні в літературі є мало даних стосовно вмісту фенольних кислот, що також мають антиоксидантні властивості.

Відомо, що культура трансформованих коренів має сильно диференційовані тканини і сприяє стабільному та екстенсивному продукуванню вторинних метаболітів, тимчасом як інші культури клітин рослин є генетично та біохімічно нестійкими і синтезують корисні вторинні метаболіти переважно у невеликій кількості [16].

Трансформовані корені, інфіковані *Agrobacterium rhizogenes*, характеризуються високими темпами росту та генетичною стабільністю. Дослідження вмісту загальних фенолів і продукції фенольних кислот у культурі трансформованих коренів *F. esculentum* з коренями, стеблами, листками як джерелами експлантата для трансформації раніше не проводили. Культуру трансформованих коренів гречки (*F. esculentum* Moench) досліджували стосовно параметрів росту та певних шляхів трансформації [17–19], однак дані щодо вмісту сполук фенольної природи з екстрактів культури трансформованих коренів *F. esculentum* з різних джерел експлантів невідомі. Тому метою роботи було визначення параметрів росту культури трансформованих коренів, вмісту загальних фенолів та синтезу фенольних сполук у культурах трансформованих коренів, одержаних з різних джерел експлантів гречки за допомогою *Agrobacterium rhizogenes* штам А4.

### Матеріали і методи

*Стерилізація насіння та умови проростання*

Насіння гречки (сорт Антарія) було стерилізовано промиванням поверхні в проточній воді з милом протягом 20 хв в асептичних умовах за ламінарного потоку повітря в камері з промиванням 70%-м етанолом протягом 1 хв і замочуванням на 20 хв у 10%-му розчині гіпохлориту натрію. Після замочування насіння тричі промивали в стерильній дистильованій воді. П'ять насінин розміщували базально на агарному живильному середовищі Мурасіге–Скуга (МС) [20] у чашках Петрі (100 x 15 мм). Середовище МС із сахарозою (30 г/л) та агаром (8 г/л), рН 5,8, стерилізували в автоклаві при 121 °С упродовж 25 хв. Насіння проростало в ростовій камері у стандартних

умовах за дії люмінесцентної лампи з потоком частинок розміром 35 мкмоль с<sup>-1</sup>м<sup>-2</sup> та 16/8-годинним фотоперіодом при температурі 25 °С.

*Культивування Agrobacterium rhizogenes*

Культуру *Agrobacterium rhizogenes* штам А4 витримували на живильному середовищі МҮА (5,0 г/л дріжджового екстракту, 0,5 г/л казамінової кислоти, 8,0 г/л маніту, 2,0 г/л сульфату амонію, 5,0 г/л NaCl та 15 г/л агару) [21] протягом 48 год при 28 °С у темноті. Один клон вирощували упродовж 24 год у 20 мл рідкого середовища МҮА за 28 °С на роторному шейкері при 100 об/хв у темноті.

*Культура трансформованих коренів*

Стебла, листки та корені відділили від рослин, вирощених за умов *in vitro* (на 21-й день) і використовували як експланти для сумісного з *A. rhizogenes* культивування. Стебла (2 см), листки з черешками та корені (2–3 см завдовжки та 3 мм завширшки) відділили від загальної вегетативної маси рослини. Потім кожен експлант окремо помістили в бактеріальну суспензію на 5 хв. Експланти залишали на сухому стерильному фільтрувальному папері для видалення надлишку бактерій та інкубували в темноті за 28 °С в колбі Ерленмеєра на 200 мл з додаванням 50 мл розчину гормонів у середовищі МС із 30 г/л сахарози на роторному шейкері при 100 об/хв. Неінфіковані експланти (контроль) культивували за аналогічних умов. Після 24 год сумісного культивування експлантів тканини перемістили на нове гормональне середовище МС із 30 г/л та 500 мг/л цефотаксиму для знешкодження бактерій, а потім інкубували в темноті. Численні трансформовані корені було одержано шляхом культивування упродовж 2 тижнів. Трансформовані корені відокремили від експлантів тканин і перенесли в темноті за 25 °С на рідке середовище МС із гормонами. Після повторного перенесення на свіже середовище отримали швидкорослі культури трансформованих коренів. Потім ізольовані корені (300 мг) перенесли на 50 мл рідкого середовища МС, що містило 30 г/л сахарози у флаконах на 200 мл. Культуру трансгенних коренів культивували при 25 °С на роторному шейкері (100 об/хв) у ростовій камері за стандартних 16/8 г умов фотоперіоду. Після трьох тижнів культивування культури трансгенних коренів було відібрано й визначено вміст загальних фенолів та фенольних кислот. Для кожної культури

аналізували шість колб і двічі повторювали експеримент.

#### Метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)

Геномну ДНК різних трансгенних культур гречки було ідентифіковано методом ПЛР та виділено за допомогою набору для екстракції ДНК (мастер-Р-комплект геномного очищення ДНК, A1120, Promega, США). ПЛР проводили із застосуванням детектующого ампліфікатора ДТ-322. Геномну ДНК, використовувану як шаблон для ПЛР, було виділено з коренів шляхом вирізання фрагментів з інфікованих та неінфікованих рослин (контроль). Для дослідження активності гена *rolB* використовували праймери 5'-АСТАТАГСАААССССТССТГС-3' та 5'-ТТСАГГТТТАСТГСАГСАГГС-3, а також амплікон розміром 652 п.н. (GmbH, Ульм, Німеччина). Підсилення циклу було забезпечено процесом денатурації при 95 °С протягом 1 хв, відпалом — 55 °С, 1 хв, та синтезом — 72 °С, 1 хв. Після 30 повторів термічного циклу та кінцевої елонгації при 72 °С упродовж 5 хв продукти ампліфікації аналізували на 1,5% -му агарозному гелі.

#### Підготовка зразків для визначення вмісту сполук фенольної природи

Зразки отримували в два етапи. Спочатку 0,02 г сухого матеріалу переносили в епендорфи, додаючи 1 мл дистильованої води. Зразки нагрівали 15 хв при 95 °С. Потім рослинний матеріал центрифугували 5 хв (12 000 об/хв, 25 °С). Екстракт повторно переносили в новий епендорф. До супернатанта знову додавали 1 мл дистильованої води і нагрівали 10 хв при 95 °С. Супернатант центрифугували 5 хв (12 000 об/хв, 25 °С). Екстракт знову переносили в новий епендорф. Усі зразки було проаналізовано шість разів. Вміст загальних фенолів визначали з реагентом Фоліна [22].

#### Визначення складу фенольних кислот за допомогою високоефективної рідинної хроматографії

20 мг сухого рослинного матеріалу екстрагували 15 хв із 750 мкл 70% -го метанолу в ультразвуковій бані (Sonorex цифровий 10p, Bandelin) на льоду. Зразки центрифугували 5 хв при 6 000 об/хв. Супернатанти відбирали, а зразки повторно екстрагували двічі з 500 мкл 70% -го метанолу. На наступному етапі зразки доводили до 1 мл 40% -м ацетонітрилом. Для фільтрації зразків використовували фільтр 0,22 мкмоль, а потім

аналізували за допомогою високоефективної рідинної хроматографії системою Dionex P680A, що має насос, ASI-100 автоматизоване введення проби, колонку AcclaimPA C16 (3 мкм, 2,1×150 мм, Dionex) та PSA-100 фотодіод масиву детекторів (Dionex) і програмне забезпечення Chromeleon 6.8 (Dionex, США). Колонка працює при температурі 35 °С. Рухома фаза складалась із 0,1% фосфорної кислоти у високоочищеній воді, що використовується у високоефективній газорідинній хроматографії (елюент А), та 40% ацетонітрилу в цій воді (елюент Б) [23]. Багатоступінчастий градієнт застосовували для всіх розділень з початкового об'єму ін'єкції 40 мкл за швидкості потоку 0,4 мл/хв. Багатоступінчастий градієнт виглядав таким чином: 0–1 хв: 0,5% елюент В; 1–10 хв: 0,5–40% елюент В; 10–12 хв: 40% елюент В; 12–18 хв: 40–80% елюент В; 18–20 хв: 80% елюент В; 20–24 хв: 80–99% елюент В; 24–30 хв: 99–100% елюент В; 30–34 хв: 100–0,5% елюент В; 34–39 хв: 0,5% елюент В. Одночасний моніторинг було виконано за 290, 330 та 254 нм і швидкості потоку 0,4 мл/хв. Кількість фенольних кислот розраховували на основі піків при 290 нм проти стандартів і з порівнянням спектрів газорідинної хроматографії [24]. Ідентифікацію та якісне оцінювання фенольних кислот здійснювали, порівнюючи час пробігу та площі піків екстрактів щодо стандартів фенольних кислот (хлорогенова, кофейна, корична, кумарова, розмаринова та синапова).

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програми Excel. Повторюваність дослідів була шестикратною. Достовірність різниці отриманих даних розраховано з використанням статистичного аналізу (ANOVA, SigmaStat 9,0).

## Результати та обговорення

### Культура трансформованих коренів

Культуру трансформованих коренів (*Fagopyrum esculentum* Moench) отримували з трьох різних джерел експлантів (корені, листки і стебла), що були інокульовані штамом A4 *Agrobacterium rhizogenes*. Після двох днів сумісного з *Agrobacterium rhizogenes* культивування експланти тканин було трансформовано для вирощування на гормональному середовищі MS, що містить 500 мг/л цефотаксиму для знешкодження *A. rhizogenes*. Видимі корені сформувались у різних експлантів після 5–7 днів на місці бактеріальної ін'єкції. Через 10–14 днів інкубування корені росли швидшими темпами.

Після чотирьох тижнів культивування трансформовані корені з різних експлантів вирізали з некротичних тканин експлантів та пересівали на свіже середовище МС. Ізольовані трансформовані корені з кожного джерела культивували в рідкому середовищі МС протягом трьох тижнів і досліджували їх ріст в шести колбах щотижня. Під час періоду культивування (рис. 1) суха маса коренів збільшувалася з початкового рівня 0,3 г/л до 21,2 г/л. Максимальний ріст 21,2, 17,7 та 14,6 г/л було ідентифіковано через три тижні в коренях, листках та стеблах відповідно.

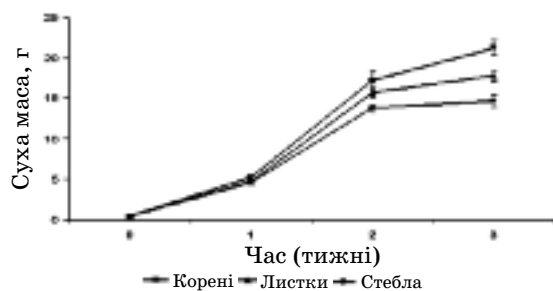


Рис. 1. Накопичення сухої маси в трансформованих коренях гречки різних джерел експлантів, вирощених на рідкому середовищі МС упродовж трьох тижнів

#### Полімеразна ланцюгова реакція

Відомо, що ген *rol B* Rі-плазміді *Agrobacterium rhizogenes* відповідає за індукцію трансформації коренів у рослин. Аби встановити включення *rol*-генів та виявити трансформацію, було проведено ПЛР за допомогою праймерів, специфічних (або комплементарних) гену *rol B* (рис. 2), яка підтвердила, що ген *rol B* був присутній у всіх трансформованих експлантах коренів, листків та стебел.

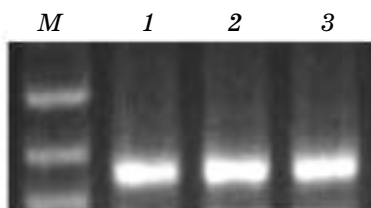


Рис. 2. Аналіз результатів ампліфікації фрагмента гена *rol B* з різних експлантів трансформованих коренів гречки звичайної *Fagopyrum esculentum* (Moench): М — маркер молекулярної маси (652 п.н.); 1 — стебло; 2 — листки; 3 — корені

#### Вміст загальних фенолів

Результати досліджень показали зростання вмісту загальних фенолів у трансформованих коренях гречки з різних джерел експлантів гречки звичайної. Найбільше зростання було відзначено для трансформованих коренів гречки з листків та коренів.

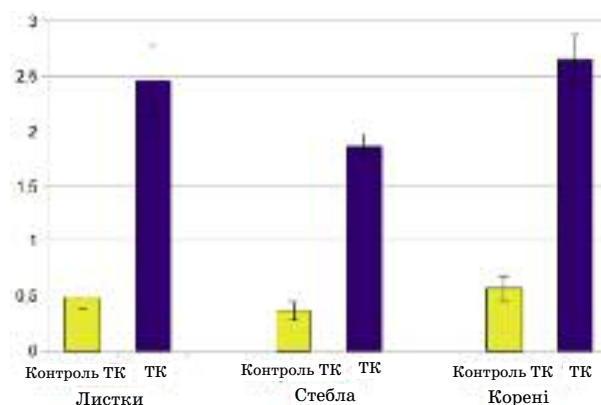


Рис. 3. Вміст загальних фенолів у трансформованих коренях гречки з різних джерел експлантів гречки звичайної *Fagopyrum esculentum* Moench: (мг/г сухої речовини), ТК — трансформовані корені

Попередніми дослідженнями було показано, що вміст загальних фенолів зростає у культурі трансформованих коренів шавлії (*Salvia miltiorrhiza*) [25]. Також він був вищий у культурі трансформованих коренів анісу *Pimpinella anisum* L. (з коренів як джерела експланту) [26]. Зростання продукції фенолів було відзначено у трансформованих коренів гречки звичайної, рівень продукції відрізнявся у різних морфологічних фенотипів гречки татарської *Fagopyrum tataricum* Gaertn [27].

#### Аналіз складу фенольних кислот

Трансформація коренів за допомогою *A. rhizogenes* характеризується високими темпами росту, генетичною стабільністю та зростанням рівня певних гормонів. Це культурі генетично трансформованих коренів, які можуть продукувати підвищений рівень вторинних метаболітів порівняно з рослинами, що ростуть за нормальних умов [28].

Ізольовані трансформовані корені гречки в рідкому середовищі відзначаються високою продуктивністю рутину, глікозидів та флавонолів [19]. Концентрація фенольних сполук у трансформованих коренях гречки татарської була в кілька разів вищою порівняно з контролем [29].

Відмінності в продуктивності фенольних сполук у культурі трансформованих коренів гречки було досліджено раніше [17, 18]. Культура трансформованих коренів гречки *Fagopyrum tataricum* після 21 доби культивування продукує (-)-епігалокатехін, хлорогенову та кавові кислоти, рутин [27].

Серед фенольних сполук особливе місце посідають фенольні кислоти, які містяться



в рослинах у вільній формі у вигляді глікозидів і можуть бути інтегровані в більші молекули у формі ефірів. Вони поширені як депсиди — міжмолекулярні ефіри, що складаються з однієї чи різних фенольних кислот, зокрема кавової, кумарової, ферулової, галової. Депсиди — це також хлорогенова, а також ізохлорогенова, елагова, літоспермова та розмаринова кислоти. Деякі фенольні кислоти мають виражені антиоксидантні властивості [30].

У культурі трансформованих коренів гречки з різних джерел експлантів (корені, листки та стебла) було ідентифіковано такі фенольні сполуки: *p*-гідроксибензойна кислота, хлорогенова кислота, ванілінова кислота, кавова, *p*-кумарова, гесперитинова, *p*-анісова та цинамова кислоти (таблиця). Також було виявлено високий вміст *p*-гідроксибензойної, гесперитинової та *p*-анісової кислот. Вміст фенольних кислот був різним у варіантах з різними джерелами експлантів у культурі трансформованих коренів. Так, для трансформованих коренів гречки з коренів були характерні більш високі показники акумуляції ідентифікованих фенольних кислот порівняно з культурами трансформованих коренів гречки з листків та стебел. Однак не для всіх культур трансформованих коренів гречки з різних джерел експлантів було виявлено високу інтенсивність синтезу певних фенольних кислот порівняно з контролем.

Показано, що *p*-гідроксибензойна кислота підвищує непроникність клітинної стінки, що призводить до збільшення опору інфекції в культурі трансформованих коренів дурману [31]. У трансформованих тканинах дурману було виділено бактеріальний ензим 4-гідроксицинамол-КоА гідратазу / ліази та показано його зв'язок з накопиченням *p*-гідроксибензойної кислоти в розчинній формі [32]. Це було також встановлено (390 мкг/г сухої маси) для культури трансформованих коренів *Daucus carota* після 7 діб інкубації. У нашій роботі в культурі трансформованих коренів гречки *F. esculentum* з коренями як джерелом експланта вміст розчинної *p*-гідроксибензойної кислоти збільшився на 12% порівняно з контролем і становив відповідно 0,455 мкг/г сухої маси.

Хлорогенова кислота є поширеним рослинним метаболітом, який активується захисною системою за певних форм стресу [33].

Аналіз метанольних екстрактів культури трансформованих коренів ехінацеї пурпурної за допомогою вискоефективної рідинної хроматографії показав високий вміст хлорогенової кислоти (0,93 мкг/г сухої речовини) [34]. Також високий вміст хлорогенової кислоти було встановлено в екстрактах культури трансформованих коренів *Lactuca virosa* [35]. У культурі трансформованих коренів *F. esculentum* виявлено в 3 рази вищу кількість хлорогенової кислоти

Вміст фенольних кислот у трансформованих коренях з різних джерел експлантів гречки звичайної (*Fagopyrum esculentum* Moench) (мг/г сухої речовини)

Фенольні кислоти	Контроль	Культура трансформованих коренів гречки (корені)	Культура трансформованих коренів гречки (листки)	Культура трансформованих коренів гречки (стебла)
<i>p</i> -гідроксибензойна кислота	0,399+0,016	0,455+0,023*	0,441+0,018*	0,432+0,0193*
Кофеїнова кислота	0,013+ 0,002	0,025+0,003*	0,025+0,005*	0,023+0,019*
Хлорогенова кислота	0,035+0,007	0,115+0,008*	0,109+0,010*	0,103+0,006*
Ванілінова кислота	0,024+0,002	0,029+0,003*	0,025+0,002	0,025+0,002
<i>p</i> -кумарова кислота	0,013+0,002	0,020+0,007	0,018+0,004*	0,016+0,005
Гесперитинова кислота	0,11+0,002	0,116+0,002	0,110+0,004	0,109+0,003
<i>p</i> -анісова кислота	3,43+0,180	3,891+0,250*	3,752+0,198*	3,560+0,201
Цинамова кислота	0,035+0,006	0,042+0,014	0,034+0,008	0,038+0,007

Примітка: \* $P \leq 0,05$  порівняно з контролем.



порівняно з контролем. Максимальний вміст хлорогенової кислоти був у культурі трансформованих коренів з коренями як джерелом експлантів (0,115 мг<sup>-1</sup> г сухої маси). Вміст *p*-анісової кислоти збільшився на 12%, а кавової кислоти — вдвічі в культурі трансформованих коренів з коренями порівняно з контролем. Значне збільшення вмісту *p*-анісової та кавової кислот спостерігали у варіантах культури трансформованих коренів з джерелом експланту з листків та стебел, а також і в культурі трансформованих коренів, яку було отримано після щеплення зі стерильними молодими стеблами *Fagopyrum tataricum* з *Agrobacterium rhizogenes* R1000 [27]. Кавову кислоту було ідентифіковано в етанольних екстрактах культури трансформованих коренів *Salvia miltiorrhiza* як сполуку з протимікробною та протигрибковою активністю [36].

Вміст ванілінової, *p*-кумарової, гесперитинової та цинамової кислот як у культурі трансформованих коренів експлантів різних джерел (корені, листки та стебла), так і в контрольних варіантах був без суттєвих змін.

Таким чином, результати досліджень продемонстрували, що культура трансфор-

мованих коренів є альтернативним засобом одержання *p*-гідроксibenзойної, хлорогенової, кавової та *p*-анісової кислот з *F. esculentum*. З метою поліпшення вмісту вторинних метаболітів для продукування за умов *in vitro* важливим чинником є вибір оптимальних джерел експлантів з культури трансформованих коренів.

Доведено отримання культури трансформованих коренів із різних джерел експлантів (корені, листки та стебла) з гречки звичайної. У разі культивування в рідкому середовищі культури показали стабільний ріст та накопичення біомаси. Окрім того, культура трансформованих коренів синтезує фенольні кислоти і характеризується підвищеним вмістом загальних фенолів. У досліджуваних культурах було ідентифіковано високий вміст хлорогенової, *p*-гідроксibenзойної, *p*-анісової та кофейної кислот. Ці культури є альтернативним засобом одержання фенольних кислот з *F. esculentum*. Молекулярний аналіз ПЛР підтвердив факт вбудовування гена *rol B* у трансформовані корені гречки R-плазмідями *Agrobacterium rhizogenes*.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Ali S. S., Kasoju N., Luthra A. et al. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants // Food Res. Int. — 2008. — V. 41. — P. 1–5.
2. Darley-Usmar V., Halliwell B. Blood radicals: reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system // Pharm. Res. — 1996. — V. 13. — P. 649–662.
3. Hagels H., Lapke C., Schilcher H., Riedel E. Comparison of the distribution on free amino acids and phenolics compounds in *Fagopyrum esculentum* Moench // Pharm. Pharmacol. Lett. — 1997. — V. 7. — P. 113–115.
4. Sedej I., Mandi C. A., Saka C. M. et al. Comparison of antioxidant components and activity of buckwheat and wheat flours // Cereal Chem. — 2010. — V. 87. — P. 387–392.
5. Golisz A., Lata B., Gawronski S., Fujii Y. Specific and total activities of the allelochemicals identified in buckwheat // Weed Biol. Manag. — 2007. — V. 7. — P. 164–171.
6. Alvarez-Jubete L., Wijngaard H., Arend E. K., Gallagher E. Polyphenol composition and *in vitro* antioxidant activity of amaranth, quinoa, buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking // Food Chem. — 2010. — V. 119. — P. 770–778.
7. Gallardo C., Jimenez L., Garcia-Conesa M. T. Hydroxycinnamic acid composition and *in vitro* antioxidant activity of selected grain fractions // Ibid. — 2006. — V. 99. — P. 455–463.
8. Gorinstein S., Lojek A., Cizhacek M., Pawelzik E. et al. Comparison of composition and antioxidant capacity of some cereals and pseudocereals // Intern. J. Food Sci. Technol. — 2008. — V. 43, N 4. — P. 629–637.
9. Azuma K., Nakayama M., Koshioka M. et al. Phenolic antioxidants from the leaves of *Corchorus olitorius* L. // J. Agric. Food Chem. — 1999. — V. 47. — P. 3963–3966.
10. Lancaster J. E. Regulation of skin color in apples // Crit. Rev. Plant Sci. — 1992. — V. 10. — P. 487–502.
11. Mohamed A. A., Patricia S. W., Anthon D. J. Effects of light on flavonoid and chlorogenic acid levels in the skin of 'Jonagold' apples // Sci. Hortic. — 2001. — V. 88. — P. 289–298.

12. Oomah B. D., Mazza G. Flavonoids and antioxidative activities in buckwheat // J. Agric. Food Chem. — 1996. — V. 44. — P. 1746–1750.
13. Steadman K. J., Burgoon M. S., Lewis B. A. et al. Minerals, phytic acid, tannin and rutin in buckwheat seed milling fractions // Ibid. — 2001. — V. 81. — P. 1094–1100.
14. Watanabe M. Catechins as antioxidants from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) groats // Ibid. — 1998. — V. 46, N 3. — P. 839–845.
15. Erlund I., Kosonen T., Alfthan G. et al. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers // Eur. J. Clin. Pharmacol. — 2000. — V. 56. — P. 545–553.
16. Zhi-Bi H., Min D. Hairy roots and its application in plant genetic engineering // J. Integr. Plant Biol. — 2006. — V. 48. — P. 121–127.
17. Trotin F., Moumou Y., Vasseur J. Flavanol production by *Fagopyrum esculentum* hairy and normal root cultures // Phytochemistry. — 1993. — V. 32. — P. 929–931.
18. Lee S. Y., Cho S. I., Park M. H. et al. Growth and rutin production in hairy root cultures of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.) // Prep. Biochem. Biotechnol. — 2007. — V. 37. — P. 239–246.
19. Kim Y. K., Xu H., Park W. T. et al. Genetic transformation of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.) with *Agrobacterium rhizogenes* and production of rutin in transformed root cultures // Austral. J. Crop Sci. — 2010. — V. 4, N 7. — P. 485–490.
20. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plantarum. — 1962. — V. 15. — P. 473–497.
21. Petit A., Tempe J. Isolation of *Agrobacterium* Ti-plasmid regulatory mutants // Mol. Gen. Genet. — 1978. — V. 167. — P. 147–155.
22. Singleton V. L., Rossi J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents // Am. J. Enol. — 1965. — V. 16. — P. 144–158.
23. Cai Z., Kastell A., Mewis I. et al. Polysaccharide elicitors enhance anthocyanin and phenolic acid accumulation in cell suspension cultures of *Vitis vinifera* // Plant Cell Tiss. Organ Cult. — 2012. — V. 108. — P. 401–409.
24. Mewis I., Smetanska I., Muller C., Ulrichs C. Specific polyphenolic compounds in cell culture of *Vitis vinifera* L. cv. Gamay Freaux. Appl // Biochem. Biotechnol. — 2011. — V. 164, N 2. — P. 148–161.
25. Yan Q., Shi V., Ng J., Yong Wu J. Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots // Plant Sci. — 2006. — V. 170, N 4. — P. 853–858.
26. Andarwulan N., Shetty K. Phenolic content in differentiated tissue cultures of untransformed and *Agrobacterium*-transformed roots of anise (*Pimpinella anisum* L.) // J. Agric. Food Chem. — 1999. — V. 47, N 4. — P. 1776–1780.
27. Park N., Xiao H. Li., Uddin M. R., Un Park S. G. Phenolic compound production by different morphological phenotypes in hairy root cultures of *Fagopyrum tataricum* Gaertn // Arch. Biol. Sci. Belgrade. — 2011. — V. 63, N 1. — P. 193–198.
28. Srivastava S., Srivastava A. K. Hairy root culture for mass — production of high — value secondary metabolites // Crit. Rev. Biotechnol. — 2007. — V. 27, N 1. — P. 29–43.
29. Kim Y. K., Li X., Xu H. et al. Production of phenolic compounds in hairy root culture of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn) // J. Crop. Sci. Biotechnol. — 2009. — V. 12, N 1. — P. 53–57.
30. Sroka Z. Antioxidative and antiradical properties of plant phenolics // Z. Naturforsch. — 2005. — V. 60 C. — P. 833–843.
31. Horváth E., Pál M., Szalai G., Páldi E., Janda T. Exogenous 4 — hydroxybenzoic acid and salicylic acid modulate the effect of short-term drought and freezing stress on wheat plants // Biologia Plantarum. — 2007. — V. 51, N 3. — P. 480–487.
32. Mitra A., Mayer M. J., Mellon F. A. et al. 4-Hydroxycinnamoyl-CoA- hydratase/lyase, an enzyme of phenylpropanoid cleavage from *Pseudomonas*, causes formation of C6-C1 glucose conjugates when expressed in hairy roots of *Datura stramonium* // Planta. — 2002. — V. 15. — P. 79–89.
33. Grace S. C., Logan B. A. Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. — 2000. — V. 355. — P. 1499–1510.
34. Liu C.-Z., Abbasi B. H., Gao M. et al. Caffeic acid derivatives production by hairy root cultures of *Echinacea purpurea* // J. Agric. Food Chem. — 2006. — V. 54, N 22. — P. 8456–8460.
35. Stojakowska A., Malarz J., Szewczyk A., Kisiel W. Caffeic acid derivatives from a hairy root culture of *Lactuca virosa* // Acta Physiol. Plant. — 2012. — V. 34. — P. 291–298.
36. Zhao J., Lou J., Mou Y. et al. Diterpenoid tanshinones and phenolic acids from cultured hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* bunge and their antimicrobial activities // Molecules. — 2011. — V. 16. — P. 2259–2267.

**НАКОПЛЕНИЕ СОЕДИНЕНИЙ  
ФЕНОЛЬНОЙ ПРИРОДЫ В КУЛЬТУРЕ  
ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КОРНЕЙ  
РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ  
ЭКСПЛАНТОВ ГРЕЧКИ ОБЫКНОВАННОЙ  
(*Fagopyrum esculentum* Moench)**

*О. В. Ситар*<sup>1,2</sup>  
*А. М. Габр*<sup>2,3</sup>  
*Н. Ю. Таран*<sup>1</sup>  
*И. Н. Сметанская*<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Киевский национальный университет имени  
Тараса Шевченко, Украина;

<sup>2</sup>Берлинский технический университет,  
Берлин, Германия

<sup>3</sup>Национальный исследовательский центр,  
Каир, Египет

<sup>4</sup>Университет прикладных наук, Вайнцбах,  
Германия

*E-mail:* o\_sytar@ukr.net

Исследовали параметры роста культуры трансформированных корней, содержание общих фенолов и особенности синтеза фенольных соединений в культурах трансформированных корней, полученных из разных источников эксплантов гречки с помощью *Agrobacterium rhizogenes* штамм А4. Использовали методы получения трансформированной культуры корней, определения общих фенолов, газожидкостной хроматографии, полимеразной цепной реакции. Установлено повышение содержания общих фенолов в трансформированных корнях гречки из разных источников эксплантов. В исследуемых культурах было идентифицировано высокое содержание хлорогеновой, *p*-гидроксibenзойной, *p*-анисовой и кофейной кислот, что свидетельствует о возможности их промышленного получения. Максимальный рост культуры трансформированных корней был равен 21,2 г/л в культуре с корнями, 17,7 г/л — с листьями и 14,6 г/л — со стеблями на 3-ю неделю после трансплантации. Встраивание гена *rol B* в трансформированные корни растений гречки с помощью Ri-плазмид *Agrobacterium rhizogenes* подтверждено с помощью полимеразной цепной реакции.

**Ключевые слова:** *Fagopyrum esculentum* Moench, фенолы, фенольные кислоты, *Agrobacterium rhizogenes*, культура трансформированных корней.

**THE PHENOLS ACCUMULATION  
IN TRANSFORMED ROOT CULTURES  
OF DIFFERENT EXPLANTS SOURCES  
OF COMMON BUCKWHEAT  
(*Fagopyrum esculentum* Moench)**

*O. V. Sytar*<sup>1,2</sup>  
*A. M. Gabr*<sup>2,3</sup>  
*N. Yu. Taran*<sup>1</sup>  
*I. M. Smetanska*<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Taras Shevchenko National University  
of Kyiv, Ukraine;

<sup>2</sup>Berlin University of Technology,  
Germany

<sup>3</sup>National Research Center,  
Cairo, Egypt

<sup>4</sup>University of Applied Science Weidenbach,  
Germany

*E-mail:* o\_sytar@ukr.net

The growth parameters of transformed root cultures, total phenolic content and phenolic acids composition has been studied in root cultures, which were obtained from various explants of buckwheat by *Agrobacterium rhizogenes* strains A4. The methods of obtaining of the transformed root cultures, total phenol estimation, gas-liquid chromatography and polymerase chain reaction has been used. Elevated levels of total phenols in transformed roots of buckwheat from different sources of explants have been found. The high content of chlorogenic, *p*-hydroxybenzoic, *p*-anisic and caffeic acids has been discovered in the root cultures, which can be used for their industrial production. Maximal root growth was equal 21.2 g/l of dry weight in the roots as source for root culture, 17.7 g/l with leaves and 14.6 g/l with stems at 3 week after placement. Molecular analysis by polymerase chain reaction amplification was confirmed that the *rol B* gene (652 bp) which transferred into hairy roots from Ri-plasmid in *Agrobacterium rhizogenes* is responsible for induction of root from plant species.

**Key words:** *Fagopyrum esculentum* Moench., phenols, phenolic acids, *Agrobacterium rhizogenes*, roots.

УДК 53.03.13.21: XX.01.77: 69.09.07.07

# ОПТИМІЗАЦІЯ ЕКСТРАГУВАННЯ ФРУКТАНІВ ІЗ КУЛЬТИВОВАНИХ *in vitro* «БОРОДАТИХ» КОРЕНІВ ЦИКОРІЮ

К. С. Мазник  
Н. А. Матвеева

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії  
НАН України, Київ

E-mail: joyna56@gmail.com

Отримано 03.05.2012

Досліджували залежність ефективності екстрагування фруктанів від тривалості попереднього замочування, температури і тривалості високотемпературної екстракції. Для дослідження використовували висушені й подрібнені трансгенні корені цикорію *Cichorium intybus* L. сорту Пала росса, одержані шляхом трансформації з використанням *Agrobacterium rhizogenes* із вектором pСВ161. Застосовували низько- та високотемпературне екстрагування: без нагрівання за +22 °С протягом 0,5; 1 і 24 год та з нагріванням при +70 °С; 80 °С і 90 °С упродовж 10; 20 і 30 хв. Фракціонування фруктанів здійснювали двома шляхами: розділенням фракцій кристалізацією — високомолекулярною за +4 °С та відділенням низькомолекулярною екстракцією 95%-м етанолом. Для визначення концентрації фруктанів у екстрактах послуговувалися методом Мак-Рері і Слаттері.

На підставі експериментальних даних було побудовано математичну модель процесу екстрагування фруктанів, перевірено її адекватність за допомогою критерію Фішера та коефіцієнта детермінації, встановлено оптимальні параметри екстракції з використанням методів лінійного програмування. Екстрагування протягом 30 хв при 90 °С без попереднього замочування визначено як найбільш технологічне, що дає змогу екстрагувати основну масу фруктанів із трансгенних коренів ( $146 \pm 8,77$  мг/г сухої маси коренів).

Оптимальним режимом виділення фруктанів з культури «бородатих» коренів цикорію є екстрагування за температури +90 °С упродовж 30 хв; тривалість попереднього замочування не впливає на ефективність екстракції. Найбільш ефективним режимом отримання низько- та високомолекулярної фракцій фруктанів із трансгенних коренів цикорію є двоступінчасте екстрагування 95%-м етанолом за +80 °С та водою при +90 °С; тривалість кожного етапу становила 30 хв.

**Ключові слова:** фруктани, *Cichorium intybus* L., фракціонування, оптимізація екстрагування.

Генетична трансформація є стресовим чинником стосовно рослини і може спричинювати певні зміни біохімічних процесів. Однією з них є підвищення синтезу і накопичення запасних сполук, зокрема поліфруктанів [1]. Трансгенні корені можуть бути джерелом отримання поліфруктанів, у тому числі інуліну, оскільки використання біотехнологічних методів дає змогу підвищити синтез цих сполук. Фруктани — полісахариди, молекула яких побудована із залишків D-фруктози. Їх застосовують у харчовій промисловості та в медицині, однак зараз лише інулін виробляють у великих обсягах. Фруктани використовують як дієтичну добавку до раціону за порушень вуглеводного, ліпідного обміну та обміну кальцію [2–4], при дисбактеріозах [5–7], а також онкозахворюваннях [8, 9]. Інулін є повноцінним замінником глюкози, має гіпоглікемічні властивості, знижує вміст холестерину

та тригліцеридів у крові хворих на діабет [10]. Фруктани є так званими харчовими волокнами і мають якості сорбенту, що сприяє виведенню токсичних речовин зі шлунково-кишкового тракту [11].

Фруктани отримують зазвичай з природного рослинного матеріалу. Разом з тим вони також у значній кількості накопичуються в «бородатих» коренях [12, 13], які у разі розроблення оптимальної технології культивування та екстрагування можуть бути технологічним джерелом одержання необхідних сполук. Раніше нами було визначено вплив умов вирощування *in vitro* на накопичення фруктанів у «бородатих» коренях цикорію [13]. Розроблення методики ефективного виділення і фракціонування фруктанів є продовженням цих досліджень з метою отримання поліфруктанів з культивованих *in vitro* коренів.



### Матеріали і методи

В експериментах застосовували «борода-ті» корені цикорію *C. intybus* сорту Пала росса, які було отримано нами раніше [12]. Корені вирощували на агаризованому безгормональному середовищі Мурасіге–Скуга [14] зі зменшеною вдвічі концентрацією макроелементів (1/2 MS) за температури 24 °С протягом шести тижнів. Для екстрагування фруктанів корені промивали, висушували до постійної маси, перетирали у ступці (діаметр частинок менше 1 мм) і використовували для подальших досліджень.

Для екстрагування фруктанів по 50 мг висушених та розтертих коренів вміщували в епендорфи, додавали по 1 мл дистильованої води і витримували за температури 22 °С протягом 0,5, 1 та 24 год (низькотемпературне екстрагування). Після цього проводили теплову екстракцію фруктанів на водяній бані за температури 70, 80 і 90 °С упродовж 10, 20 і 30 хв. Екстракт відділяли центрифугуванням протягом 5 хв, 15 000 об/хв (у всіх експериментах використовували мікроцентрифугу Eppendorf 5415C).

З метою фракціонування фруктанів проводили 2 варіанти досліду: 1) розділення фракцій осаджуванням високомолекулярної фракції (ВМФ) при температурі +4 °С; 2) відділення низькомолекулярної фракції (НМФ) екстрагуванням за допомогою етанолу. Для реалізації першого варіанта відділяли надосадову рідину водних екстрактів, отриманих після нагрівання при 90 °С протягом 30 хв. Визначаючи вплив наявних центрів кристалізації на ефективність екстрагування, в епендорфи з 0,5 мл надосадової рідини додавали 15 крупинок активованого вугілля (діаметром близько 1 мм) і вміщували в холодильну камеру (+4 °С) для кристалізації ВМФ на поверхні вугілля. Через 7 діб вугілля ВМФ відділяли центрифугуванням протягом 5 хв, 15 000 об/хв.

Щоб розчинити фруктани, адсорбовані на поверхні вугілля або осаджені на стінках ємності, в епендорфи додавали 0,5 мл води та інкубували на водяній бані (90 °С, 30 хв), далі центрифугували протягом 5 хв при 15 000 об/хв. Надосадову рідину відбирали та визначали концентрацію фруктанів.

Для реалізації другого варіанта досліду висушені корені зважували, додавали 1 мл етанолу, інкубували на водяній бані за 80 °С протягом 30 хв для екстрагування НМФ фруктанів, центрифугували упродовж 5 хв при 15 000 об/хв. Надосадову рідину відбирали для визначення концентрації фруктанів.

Для екстракції ВМФ до осаду додавали 1 мл дистильованої води і витримували на водяній бані протягом 30 хв при температурі 90 °С, центрифугували 5 хв за 15 000 об/хв. Надосадову рідину відбирали для визначення кількості фруктанів.

Концентрацію фруктанів у екстрактах визначали із застосуванням методу МакРері і Слаттері [15]. Для цього в епендорфи з 0,5 мл екстракту додавали 0,5 мл 0,1%-го спиртового розчину резорцину і 0,5 мл 80%-го розчину HCl, перемішували і ставили на водяну баню (80 °С, 20 хв). Потім визначали оптичну густину розчинів за допомогою ФЕК (Eppendorf BioPhotometer plus) за довжини хвилі 550 нм. Концентрацію фруктанів оцінювали за калібрувальним графіком (калібрування за фруктозою).

Усі визначення проводили в десятикратній повторюваності. Статистичну обробку отриманих даних здійснювали в системі електронних таблиць Microsoft Excel, рівень вірогідності  $P \leq 0,05$ .

### Результати та обговорення

У ході експериментів було отримано дані щодо залежності кількості екстрагованих фруктанів від тривалості попередньої екстракції при температурі +22 °С ( $T_1$ ), температурі теплової екстракції ( $t^\circ$ ) та її тривалості ( $T_2$ ) (рис. 1).

З наведених діаграм видно, що тривалість попереднього замочування рослинного матеріалу при температурі +22 °С практично не впливає на вихід фруктанів за режиму високотемпературної екстракції +90 °С протягом 30 хв.

У процесі екстрагування при температурі 70 °С (попереднє замочування коренів упродовж 24 год) вихід фруктанів був найменшим і становив за екстракції протягом 10, 20 та 30 хв  $74 \pm 1,69$ ,  $77 \pm 1,61$  та  $86 \pm 5,82$  мг/г маси відповідно. Підвищення температури екстракції до +90 °С призводило до підвищення концентрації фруктанів у екстрактах в 1,7 раза порівняно з екстрагуванням при +70 °С упродовж 30 хв. Подальше підвищення температури екстрагування (до +95 °С) не спричинювало достовірного збільшення концентрації екстрагованих фруктанів. За збільшення тривалості температурної екстракції з 10 до 30 хв при +70 °С та +80 °С концентрація фруктанів у екстрактах зростала відповідно в 1,16 та 1,53 раза. Разом з тим збільшення тривалості температурної екстракції при +90 °С достовірно не підвищувало вихід екстрагованих фруктанів.



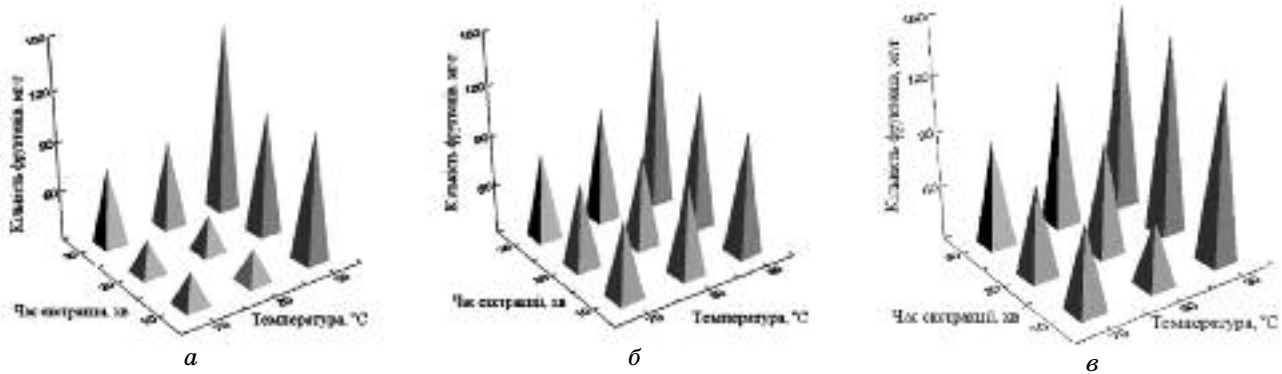


Рис. 1. Залежність кількості екстрагованих фруктанів від температури ( $t^\circ$ ) і тривалості теплової екстракції ( $T_2$ ):

тривалість попередньої екстракції ( $T_1$ ) при температурі  $+4^\circ\text{C}$ : *a* — 0,5 год; *b* — 1 год; *c* — 24 год ( $P \leq 0,05$ )

Максимальна кількість екстрагованих фруктанів за температури  $+90^\circ\text{C}$  протягом 30 хв становила  $146 \pm 8,77$  мг/г сухої маси коренів.

Отримані дані було використано для побудови математичної моделі процесу екстрагування та теоретичного визначення оптимальних параметрів цього процесу (статистичні обрахунки результатів експерименту проводили в системі електронних таблиць Microsoft Excel). У роботі наведено методику оптимізації, яка базується на поєднанні двох методів: кореляційно-регресійного аналізу та вибору оптимального плану.

Узагальнюючи існуючі підходи до оптимізації статичних процесів, було діагностовано відсутність методики, яка б комплексно забезпечувала розв'язання таких задач:

1) встановлення форми зв'язку між результативною ознакою процесу і набором факторних ознак;

2) визначення відповідних коефіцієнтів регресії;

3) знаходження найбільш прийнятних факторів для досягнення необхідного результату (розв'язання задачі оптимального планування з використанням методів лінійного програмування).

Для вирішення поставлених завдань доцільно використовувати узгоджене поєднання таких інструментів статистичного аналізу MS Excel:

1. Пакет статистичних функцій «Регресія».

2. Сервіс «Пошук рішення».

3. Параметри процесу, які визначають за допомогою інструмента «Регресія».

Після апроксимації експериментальних даних поліномом третього порядку отримано рівняння множинної регресії ( $T_1$  — тривалість попередньої екстракції при темпера-

турі  $+22^\circ\text{C}$ ,  $T_2$  — тривалість теплової екстракції,  $t^\circ$  — температура екстракції):

$$C = 12,395 \cdot t^\circ + 22,549 \cdot T_1^2 - 0,318 \cdot t^{\circ 2} - 0,01 \cdot T_2^2 - 0,938 \cdot T_1^2 + 0,002 \cdot t^{\circ 2} + 0,001 \cdot T_2^2.$$

Пропонована залежність має найкращі, порівняно з іншими дослідженими рівняннями, статистичні характеристики щільності зв'язку ( $R = 0,9919$ ) та істотність зв'язку на основі критерію Фішера ( $F$ ). Зв'язок є істотним з рівнем значущості  $\alpha$  (0, 05; 0,01; 0,001), тобто цю модель можна використовувати для отримання прогнозних значень та прийняття рішень. Для запропонованої моделі  $F$  становить 1298, що на два порядки перевищує табличні значення.

Інструмент сервісу «Пошук рішення» дає змогу розв'язувати задачі лінійного програмування (ЛП) будь-якого рівня складності. Послідовність застосування цього інструмента відповідає послідовності поставлення задачі ЛП:

– встановлення критерію оптимізації (максимум, мінімум, значення);

– встановлення обмежень параметрів процесу.

Критерієм оптимізації в даному досліді є максимум кількості екстрагованих фруктанів.

У результаті використання сервісу «пошук рішення» було встановлено, що при  $T_1 = 12,7$  год корені вбирають максимальну кількість води, і подальше збільшення цього параметра не впливає на зміну цільової функції.

Таким чином, з використанням побудованої математичної моделі процесу екстракції фруктанів теоретично обрано оптимальний режим екстрагування. Отримані експериментальні дані підтвердили правильність

наведених вище теоретичних розрахунків. Визначено, що за режиму теплової екстракції протягом 30 хв при температурі +90 °С екстрагується максимальна кількість фруктанів незалежно від часу попереднього замочування рослинного матеріалу за температури +22 °С.

Наступним кроком експерименту було розроблення технології розділення НМФ і ВМФ. Після аналізу наявних методів фракціонування фруктанів нами було виділено дві основні групи. Перша ґрунтується на різниці температур кристалізації ВМФ і НМФ фруктанів. Розділення ВМФ та НМФ доцільно здійснювати в температурному діапазоні від +1 °С до +4 °С [16]. Для збільшення кількості центрів кристалізації й ефективнішого розподілення рідкої та кристалічної фаз нами запропоновано використовувати активоване вугілля.

Друга група методів базується на відмінності в розчинності ВМФ і НМФ у етанолі [17, 18]. Проте ці методи мають низку недоліків. Так, екстрагування відбувається в присутності кислоти, що може призводити до гідролізу ВМФ. При цьому використовують етанол низьких концентрацій, що спричинює великі втрати високомолекулярної фракції. Водночас відомо, що ВМФ нерозчинні в 95% -му етанолі навіть під час нагрівання [15, 19]. Очевидною є необхідність модифікації наявних методик з метою їх оптимізації та підвищення ефективності екстрагування і розділення низькомолекулярних та високомолекулярних фруктанів. Нами було застосовано методики фракціонування фруктанів з кристалізацією ВМФ за зниження температури +4 °С та відділення НМФ шляхом екстрагування з використанням етанолу в концентрації 95%.

У результаті проведення експерименту із фракціонування фруктанів за допомогою кристалізації ВМФ за низьких температур було отримано такі дані (рис. 2). Додавання активованого вугілля як центрів кристалізації призводило до значного підвищення в екстрактах вмісту високомолекулярних фруктанів. Однак достовірного зменшення вмісту НМФ не спостерігали. Без використання додаткових центрів кристалізації вихід ВМФ становив 3% від загальної кількості фруктанів, а з додаванням активованого вугілля вихід ВМФ вдалося підвищити до 14% від їх загального вмісту.

У разі застосування 95% -го етилового спирту для розділення ВМФ та НМФ фруктанів вміст НМФ досягав  $128,6 \pm 7$  мг/г маси коренів, а ВМФ —  $29,5 \pm 1,9$  мг/г маси, що становить 18% від загального вмісту екстрагованих фруктанів.

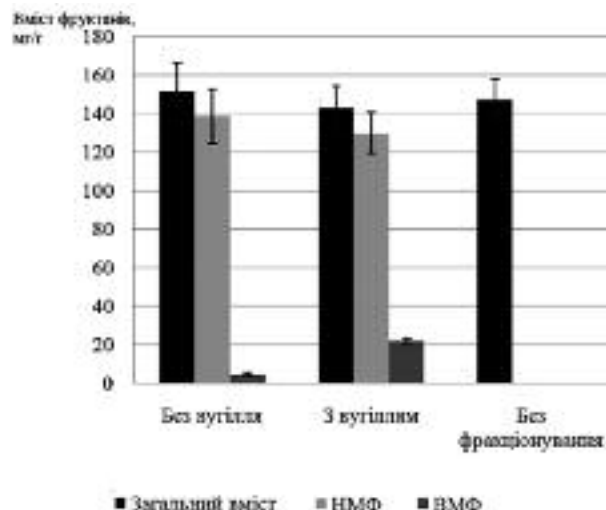


Рис. 2. Вміст низько- та високомолекулярних фруктанів за фракціонування з використанням активованого вугілля (+4 °С) ( $P \leq 0,05$ )

Таким чином, завдяки використанню 95% -го етилового спирту для фракціонування фруктанів ефективність процесу екстрагування ВМФ була вищою, ніж з активованим вугіллям — відповідно 18% та 14% від загального вмісту фруктанів у коренях.

Із застосуванням методу побудови математичної моделі теоретично на основі запропонованої нами методики, яка включає етапи побудови моделі процесу й автоматичний підбір оптимальних значень регульованих параметрів процесу, було визначено оптимальні умови екстрагування фруктанів із культури «бородатих» коренів *C. intybus* та експериментально підтверджено правильність отриманих розрахунків. Досліджено вплив таких параметрів, як тривалість попереднього замочування рослинного матеріалу, температура та тривалість екстракції під час нагрівання. Показано, що за режиму водної екстракції протягом 30 хв при 90 °С екстрагується основна маса фруктанів незалежно від тривалості попереднього замочування.

Встановлено, що фракціонування низько- та високомолекулярних фруктанів за допомогою 95% -го етанолу є більш ефективним для підвищення вмісту екстрагованої ВМФ і дає змогу отримати її в кількості 18% від загального вмісту. Визначено, що методики, які базуються на різницях температур кристалізації двох фракцій фруктанів, є менш ефективними.

Таким чином, у результаті експерименту було розроблено методику ефективного экс-

трагування фруктанів із «бородатих» коренів цикорію, яка передбачає подрібнення, екстрагування 95%-м етанолом упродовж 30 хв при температурі +22 °С; центрифугування (супернатант — фракція НМФ); повторне екстрагування водою протягом 30 хв

за температури 90 °С; центрифугування (супернатант — фракція ВМФ). Це дає змогу екстрагувати фруктани у кількості 158 мг з 1 г коренів, а також отримати фракцію ВМФ у кількості 18% від загального вмісту фруктанів.

## ЛІТЕРАТУРА

1. *Ranjitha Kumari B. D., Velayutham P., Anitha S.* A comparative study on inulin and esculin content of *in vitro* and *in vivo* plants of Chicory (*Cichorium intybus* L. cv. Lucknow Local) // *Adv. Biol. Res.* — 2007. — V. 1, N 1–2. — P. 22–25.
2. *Kok N. N., Taper H. S., Delzenne N. M.* Oligofructose modulates lipid metabolism alterations induced by a fat-rich diet in rats // *J. Appl. Toxicol.* — 1998. — V. 18, N 1. — P. 47–53.
3. *Delzenne N. M., Daubioul C., Neyrinck A. et al.* Inulin and oligofructose modulate lipid metabolism in animals: review of biochemical events and future prospects // *Br. J. Nutr.* — 2002. — V. 87, N 2. — P. 255–259.
4. *Abrams S. A., Griffin I. J., Hawthorne K. M. et al.* A combination of prebiotic short- and long-chain inulin-type fructans enhances calcium absorption and bone mineralization in young adolescents // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2005. — V. 82, N 2. — P. 471–4763.
5. *Özer D., Akin S., Özer B.* Effect of inulin and lactulose on survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-02 in acidophilus-bifidus yoghurt // *Food Sci. Technol. Int.* — 2005. — V. 11, N 1. — P. 19–24.
6. *Van der Meulen R., Avonts L., De Vuyst L.* Short fractions of oligofructose are preferentially metabolized by *Bifidobacterium animalis* DN-173 010 // *Appl. Environm. Microbiol.* — 2004. — V. 70, N 4. — P. 1923–1930.
7. *Kilian S., Kritzinger S., Rycroft C. et al.* The effects of the novel bifidogenic trisaccharide, neokestose, on the human colonic microbiota // *World J. Microbiol. Biotechnol.* — 2002. — V. 18, N 7. — P. 637–644.
8. *Pool-Zobel B. L.* Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data // *British J. Nutr.* — 2005. — V. 93, N 1. — P. 73–90.
9. *Taper H. S., Roberfroid M. B.* Nontoxic potentiation of cancer chemotherapy by dietary oligofructose or inulin // *Nutr. Cancer.* — 2000. — V. 38, N 1. — P. 1–5.
10. *Kaur N., Gupta A. K.* Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition // *J. Biosci.* — 2002. — V. 27, N 7. — P. 703–714.
11. *Kelly G.* Inulin-type prebiotics-a review: part 1 // *Altern. Med. Rev.* — 2008. — V. 13, N 4. — P. 315–329.
12. *Матвеева Н. А., Кіщенко О. М., Шаховський А. М., Кучук М. В.* Синтез інуліну в «бородатих коренях» цикорію, трансформованого за допомогою *Agrobacterium rhizogenes* // *Біотехнологія.* — 2011. — Т. 4, № 3. — С. 56–63.
13. *Матвеева Н. А., Кваско О. Ю.* Особливості накопичення поліфруктанів в трансгенних рослинах цикорію *Cichorium intybus* L. // *Вісн. укр. тов. генет. селекц.* — 2011. — Т. 9, № 1. — С. 65–69.
14. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // *Physiol Plant.* — 1962. — V. 15, N 3. — P. 473–496.
15. *Оленников Д. Н., Танхаева Л. М.* Исследование колориметрической реакции инулина с резорцином в зависимости от условий ее проведения // *Хим. раст. сырья.* — 2008. — № 1. — С. 87–93.
16. *А. с. 487118 СССР, МКИ С 13 К 3/00.* Способ получения инулина / И. М. Федоткин, А. А. Герасименко, Л. Д. Бобровник, З. Б. Шапошникова, А. С. Дыченко, В. В. Зелинский. — Заявл. 05.03.93; Опубл. 05.10.75; Бюл. 37.
17. *А. с. 1214104 СССР, МКИ А 61 К 35/78.* Способ получения инулина / В. В. Зинченко, П. П. Хворост, Н. Ф. Комиссаренко, Н. Е. Воробьев, Г. В. Оболенцева, В. А. Бирюк, В. А. Мдгварели, С. И. Бакай. — Заявл. 20.08.84; Опубл. 28.02.86; Бюл. 8.
18. *Заявка РФ 93053968, МКИ А 61 К 35/78.* Способ получения инулина из топинамбура / И. П. Чепурной, С. М. Куинцев, Э. Н. Швецов, В. Н. Гейко. — Заявл. 02.12.93; Опубл. 10.10.96; Бюл. 28.
19. *Asp N.-G.* Nutritional importance and classification of food carbohydrates / *Plant Polymeric Carbohydrates.* — F. Meuser, D. J. Manners, W. Seibel eds. — 1993. — Royal Soc. Chem., Cambridge, U.K. — P. 121–126.

## ОПТИМИЗАЦИЯ ЭКСТРАКЦИИ ФРУКТАНОВ ИЗ КУЛЬТИВИРОВАННЫХ *in vitro* «БОРОДАТЫХ» КОРНЕЙ ЦИКОРИЯ

К. С. Мазник  
Н. А. Матвеева

Институт клеточной биологии и генетической  
инженерии НАН Украины, Киев

E-mail: joyna56@gmail.com

Исследовали зависимость эффективности экстрагирования фруктанов от продолжительности предварительного замачивания, температуры и продолжительности высокотемпературной экстракции. Для исследования использовали высушенные и измельченные трансгенные корни цикория *Cichorium intybus* L. сорта Пала росса, полученные путем трансформации с использованием *Agrobacterium rhizogenes* с вектором pCB161. Применяли низко- и высокотемпературную экстракцию: без нагрева при +22 °C в течение 0,5; 1 и 24 ч и с нагревом при +70 °C, 80 °C и 90 °C в течение 10, 20 и 30 мин. Фракционирование фруктанов осуществляли двумя способами: разделением фракций путем кристаллизации — высокомолекулярной при +4 °C и отделением низкомолекулярной экстракцией 95%-м этанолом. Для определения концентрации фруктанов в экстрактах применяли метод Мак-Рери и Слаттери. На основании экспериментальных данных была построена математическая модель процесса экстракции фруктанов, проверена ее адекватность с помощью критерия Фишера и коэффициента детерминации, определены оптимальные параметры процесса экстракции с использованием методов линейного программирования. Экстрагирование в течение 30 мин при 90 °C без предварительного замачивания определено как наиболее технологичное, позволяющее экстрагировать основную массу фруктанов из трансгенных корней ( $146 \pm 8,77$  мг/г сухой массы корней).

Оптимальным режимом выделения фруктанов из культуры «бородатых» корней цикория является экстрагирование при температуре +90 °C в течение 30 мин, продолжительность предварительного замачивания не влияет на эффективность экстракции. Наиболее эффективным режимом получения низко- и высокомолекулярной фракций фруктанов из трансгенных корней цикория является двухступенчатое экстрагирование 95%-м этанолом при +80 °C и водой при +90 °C; продолжительность каждого этапа составляла 30 мин.

**Ключевые слова:** фруктаны, *Cichorium intybus* L., фракционирование, оптимизация экстрагирования.

## OPTIMIZATION OF FRUCTANS EXTRACTION FROM *in vitro* CULTIVATED CHICORY 'HAIRY' ROOTS

K. S. Maznik  
N. A. Matvieieva

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

E-mail: joyna56@gmail.com

Dependence of efficiency of fructans extraction on soaking time, temperature and time of high temperature extraction was investigated. Dried and powdered chicory *Cichorium intybus* L. cv Pala rossa «hairy» roots obtained by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation with pCB161 vector were used for study. There were used low- and high-temperature extractions without heating at +22 °C during 0.5; 1 and 24 hours and with heating at +70 °C, +80 °C and +90 °C during 10, 20 and 30 minutes. Fructans fractionation was conducted by two ways: separation of high molecular weight fraction by crystallization at +4 °C and low molecular weight separation by extraction with 95% ethanol. To determine fructans concentration in the extracts McRery and Slattery method was used. Based on the experimental data, a mathematical model of fructan extraction process was created. Its adequacy was tested with the Fisher criterion and coefficient of determination. Optimal parameters of the extraction process chosen using the methods of linear programming were determined. Extraction for 30 minutes at 90 °C without soaking identified as the most technological one. It allowed to extract fructans general amount from transgenic roots ( $146 \pm 8,77$  mg/g of root dry weight). Optimal regime of fructan obtaining from chicory «hairy» roots is extraction at +90 °C for 30 min. Preliminary soaking time does not affect any effectiveness for such extraction. The most effective mode of obtaining of low- and high molecular fractions of fructans from transgenic chicory roots is two-stage extraction with 95% ethanol at +80 °C and water at +90 °C with the duration of each stage of 30 minutes.

**Key words:** optimization, fructans, *Cichorium intybus* L., extraction, optimized fractionation.

УДК 582.28:577.158

## ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА БАЗИДІАЛЬНИХ ГРИБІВ — ПРОДУЦЕНТІВ КАТАЛАЗИ

Т. Є. Волошко  
О. В. Федотов

Донецький національний університет, Україна

E-mail: bio.graff@yandex.ua

Отримано 05.04.2012

Досліджували динаміку росту та каталазну активність штамів базидіоміцетів за їх поверхневого культивування на глюкозопептонному середовищі. Об'єктами вивчення були 57 штамів, 5 із яких належать до 5 видів порядку *Polyporales*, а 52 — до 7 видів порядку *Agaricales*. З метою вивчення динаміки росту використовували ваговий метод визначення накопичення абсолютно сухої біомаси. Каталазну активність і вміст протеїну в міцелії та культуральному фільтраті визначали спектрофотометрично і на основі отриманих даних розраховували питому каталазну активність. Встановлено рівень накопичення біомаси та каталазної активності досліджених штамів на 9-й і 12-ту добу культивування, а також здатність більшості грибів до синтезу переважно позаклітинної каталази. Результати дослідження дали змогу відібрати штами — активні продуценти каталази, зокрема *F. velutipes* F-2 та *P. ostreatus* P-208, які є перспективними для використання в біотехнології одержання препаратів ензимів.

**Ключові слова:** базидіоміцети, каталазна активність.

Каталаза (КФ 1.11.1.6) є компонентом комплексного ензиматичного захисту організму за умов оксидативного стресу. Головна її функція — розщеплення пероксиду водню на воду та молекулярний кисень, а також участь у ряді окиснювально-відновлювальних реакцій за участю різноманітних субстратів [1].

Завдяки високій каталітичній активності ензиму та його мультифункціональності, каталаза набула широкого застосування в різних галузях промисловості, сільськогосподарства та в медицині. Зокрема, її використовують у процесах деградації залишкових кількостей пероксиду водню в технологіях легкої, хімічної та харчової промисловості, як компонент біосенсорів для кількісного визначення вмісту пероксиду водню та етанолу [2–4]. Каталазу застосовують для створення антиоксидантних препаратів ензимів, а також у клінічній діагностиці в складі диференційно-діагностичних живильних середовищ для виявлення та обліку патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів [5].

Уперше виділено й досліджено властивості промислового препарату каталази з клітин печінки тварин, який, однак, є високоартісним. Розроблено методи виді-

лення каталази з мікроміцетів родів *Penicillium* та *Aspergillus*. Проте відомо, що цвілеві гриби синтезують вторинні метаболіти — мікотоксини, які є токсичними для інших живих організмів. А оскільки каталаза є широко використовуваним ензимом, це зумовило активний пошук його продуцентів серед різних груп організмів [6–10].

Останнім часом у біотехнології сформувався новий напрям — фармацевтична мікологія — наука, що вивчає шляхи практичного використання грибів, у т. ч. й базидіальних [1, 6, 11]. Переваги цих грибів перед мікроорганізмами полягають у тому, що вони здатні до росту і синтезу багатьох класів біологічно активних речовин (БАР) на відносно дешевих живильних середовищах в умовах поверхневого і глибинного культивування. При цьому вони не дають спорношення на стадії вегетативного росту, що знижує небезпеку професійних захворювань у біотехнологічному виробництві. Одержання грибних екзометаболітів не потребує значних витрат, а за деякими властивостями (оптимум рН і температури) вони є більш близькими до тваринних [1].

Важливе місце серед БАР базидіальних грибів посідають антиоксидантні оксидоредуктази. Можливість синтезу позаклітинних



ензимів базидіоміцетами дає змогу використовувати їх для отримання цільових недорогих метаболітів. Окрім того, ці гриби можна культивувати на легкодоступних та відносно дешевих живильних середовищах і промислових відходах рециклічних технологій. Однією з важливих особливостей цих продуцентів є відсутність спороношення на стадії вегетативного міцелію, що забезпечує безпеку їх культивування [12].

Метою роботи було встановлення та порівняння динаміки росту і каталазної активності базидіальних грибів та відбір активних штамів — продуцентів цього ензиму.

### Матеріали і методи

Об'єктами дослідження були 57 штамів із колекції культур шапинкових грибів кафедри фізіології рослин Донецького національного університету, що належать до 12 видів відділу *Basidiomycota*, порядку *Polyporales*: штами *Daedalea quercina* Fr. Dq-08, *Fomes fomentarius* (L. ex Fr.) Gill. T-10, *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. Gl-2, *Irpex lacteus* Fr. Il-4k, *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. Ls-08; порядку *Agaricales*: штами *Agrocybe aegerita* Fayod. 167, 218, 960, *Fistulina hepatica* Schff. ex Fr. Fh-08, *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing. F-03, F-06, F-073, F-1, F-10, F-102, F-104, F-107, F-112, F-2, F-202, F-204, F-vv, F-610, *Pleurotus citrinopileatus* Singer. P-citr., *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Quéf. P-er, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) P. Kumm. D-140, Hk-35, P-004, P-01, P-035, P-039, P-081, P-082, P-083, P-087, P-088, P-089, P-105, P-107, P-12k, P-191, P-192, P-203, P-206, P-208, P-209, P-210, P-6v, P-кл, P-14, P-4к, P-91, P-94, P-998, P-447, P-2175, *Schizophyllum commune* Fr.: Fr. Sc-10. Переважну більшість інтродукованих штамів (88%) виділено в чисту культуру з дикоростучих плодівих тіл базидіоміцетів, зібраних в різних місцевостях Донецької області, систематичне положення встановлено згідно з даними літератури [13].

З метою вивчення каталазної активності (КА) дослідні штами культивували поверхнево в колбах Ерленмеєра на глюкозопептонному живильному середовищі (ГПС, рН  $6,5 \pm 0,2$ ) об'ємом 50 мл такого складу (г/л): глюкоза — 10,0; пептон — 3,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0,6;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  — 0,4;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,5;  $\text{CaCl}_2$  — 0,05;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,001. Інокулюмом слугували 10-денні міцеліальні культури штамів на сусло-агарі. Температура культивування становила  $27,5^\circ\text{C}$ . Строк ферментації —

12 діб, це зумовлено недоцільністю довгострокового культивування продуцентів та максимумом каталазної активності саме в період експоненціального росту, що доведено в попередніх дослідженнях [12]. Матеріалами для дослідів були гомогенізований міцелій (МГ) та культуральний фільтрат (КФ), які одержували таким чином. Міцелій при  $5 \pm 1^\circ\text{C}$  відділяли від культуральної рідини шляхом фільтрування, додатково підсушували на фільтрувальному папері й охолоджували до  $+1 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Підготовлений міцелій гомогенізували, розтираючи його в охолодженій ступці.

КА визначали в міцелії (на одиницю маси, г) та культуральному фільтраті (на одиницю об'єму, мл) на 9-ту й 12-ту добу культивування спектрофотометрично, ґрунтуючись на здатності пероксиду водню утворювати із солями молібдену стійкий забарвлений комплекс. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі СФ-26 (Росія) за довжини хвилі 410 нм проти нульової проби з дистильованою водою. За одиницю активності каталази приймали таку кількість ензиму, яка бере участь у перетворенні 1 мкат пероксиду водню за 1 с при заданих умовах. Каталазну активність розраховували за формулою [14]:

$$\text{КА} = (\text{A}_\text{к} - \text{A}_\text{д}) \cdot \text{V} \cdot \text{t} \cdot \text{k} \cdot \text{p} \quad (\text{мкат} / \text{л}),$$

де КА — каталазна активність (мкат/л);  $\text{A}_\text{к}$  та  $\text{A}_\text{д}$  — екстинкція контрольної та дослідної проб; V — об'єм внесеної проби (0,1 мл); t — час інкубації (600 с); k — коефіцієнт мілімолярної екстинкції пероксиду водню, що дорівнює  $22,2 \cdot 10^3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ; p — коефіцієнт розведення.

Вміст водорозчинного протеїну в МГ та КФ визначали методом Лоурі-Хартрі [15].

Абсолютно суху біомасу (АСБ) міцелію встановлювали ваговим методом [16].

Питому каталазну активність (КА<sub>ПТ</sub>) розраховували за формулою:

$$\text{КА}_{\text{ПТ}} = \text{КА} / \text{С}_\text{Б},$$

де  $\text{С}_\text{Б}$  — концентрація протеїну в 1 мл КФ або гомогенату міцелію (мг/мл).

Дослідження проводили у трикратній повторюваності. Статистичну обробку здійснювали з використанням програм для статистичної обробки результатів біологічних експериментів. З метою визначення впливу терміну культивування на активність досліджуваних ензимів було проведено однофакторний дисперсійний аналіз. Достовірною вважали різницю за рівня вірогідності  $P > 0,95$ . Експериментальні дані обробляли

статистично, розраховуючи середнє значення з поправкою на стандартну похибку та порівнювали їх за критерієм Дункана (дані не порівнюють з контролем). Рисунки виконано у вигляді гістограми із зазначенням вірогідного інтервалу [16, 17].

### Результати та обговорення

На першому етапі досліджень визначали накопичення біомаси штамами базидіоміцетів на 9-ту й 12-ту добу культивування на ГПС (рис. 1).

У всіх досліджених штамах максимуму накопичення абсолютно сухої біомаси було досягнуто на 12-ту добу культивування. Найбільш продуктивними щодо цього показника є штами *F. velutipes* F-610 та *P. ostreatus* D-140 і P-203. Найнижчі значення біомаси зафіксовано для штамів *P. ostreatus* P-14 і P-192 та *P. citrinopileatus* P-citr. Отже, досліджені штами мають індивідуальні значення росту — накопичення біомаси в застосованих умовах культивування. Було виявлено значні коливання цього показника і в межах одного виду, що пояснюється індивідуальною мінливістю штамів. Так, швидкість накопичення АСБ для штамів *P. ostreatus* різнилась у 27,6 раза на 9-ту добу культивування і в 14,3 раза — на 12-ту, а для штамів *F. velutipes* — у 13,4 раза на 9-ту і 7,2 раза — на 12-ту добу ферментації.

КА і вміст протеїну в мікологічному матеріалі, а також питома КА міцелію та культурального фільтрату штамів базидіоміцетів наведено на рис. 2 та рис. 3 відповідно.

Для більшості штамів є характерною позитивна кореляція вивчених показників: найвищий рівень КА<sub>ПТ</sub> як у міцелії, так і в КФ відповідає 12-й добі культивування. КА<sub>ПТ</sub> міцелію деяких штамів, зокрема *Fomes fomentarius* T-10, *Pleurotus ostreatus* P-004, P-01, P-035, P-082, P-107, P-447 та *Schizophyllum commune* Sc-10, а також КА<sub>ПТ</sub> КФ штамів *Pleurotus ostreatus* Hk-35, P-004, P-035, P-082 та інших, навпаки, знижується наприкінці терміну росту. Це, найімовірніше, пояснюється субстратною регуляцією активності ензиму й індивідуальними характеристиками цих штамів.

За даними дослідження, переважна більшість штамів базидіоміцетів (93%) синтезують позаклітинну каталазу, що підтверджується вищим рівнем її активності в КФ порівняно з міцелієм. Очевидно, це можна пояснити тим, що в природі синтез екстрацелюлярної каталази дереворуйнівними базидіоміцетами зумовлений генетично та індукуюється субстратом. У наших дослідках більшість міцеліальних культур також продукують ензими в живильне середовище, де відбувається розщеплення його компонентів. Так, у культуральному фільтраті абсолютний максимум питомої каталазної

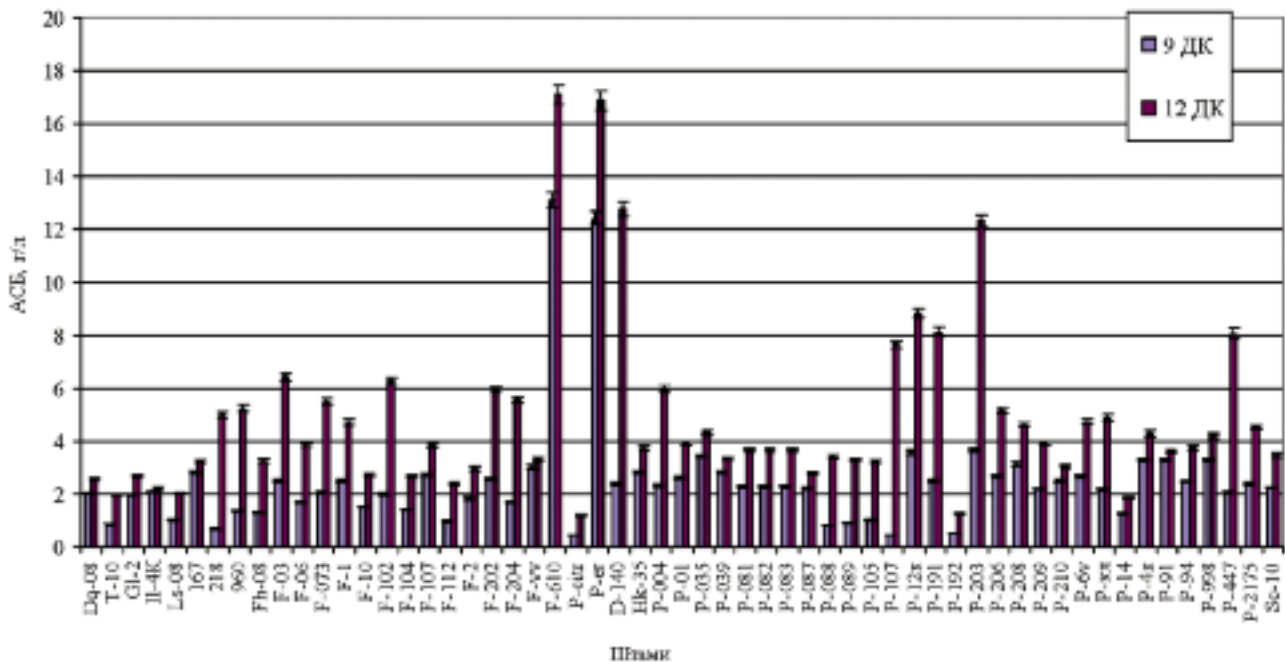


Рис. 1. Накопичення біомаси штамами базидіоміцетів на 9-ту (9 ДК) і 12-ту (12 ДК) добу культивування

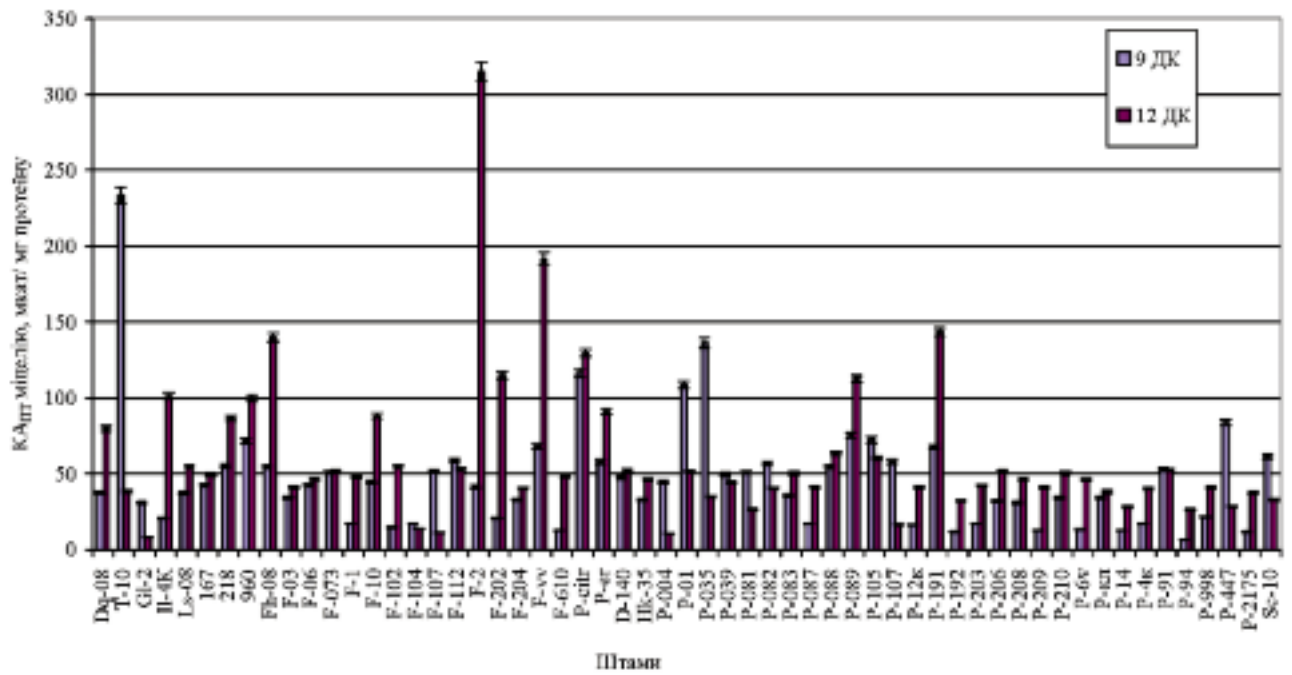


Рис. 2. Питома каталазна активність міцелію штамів базидіоміцетів на 9-ту (9 ДК) і 12-ту (12 ДК) добу культивування

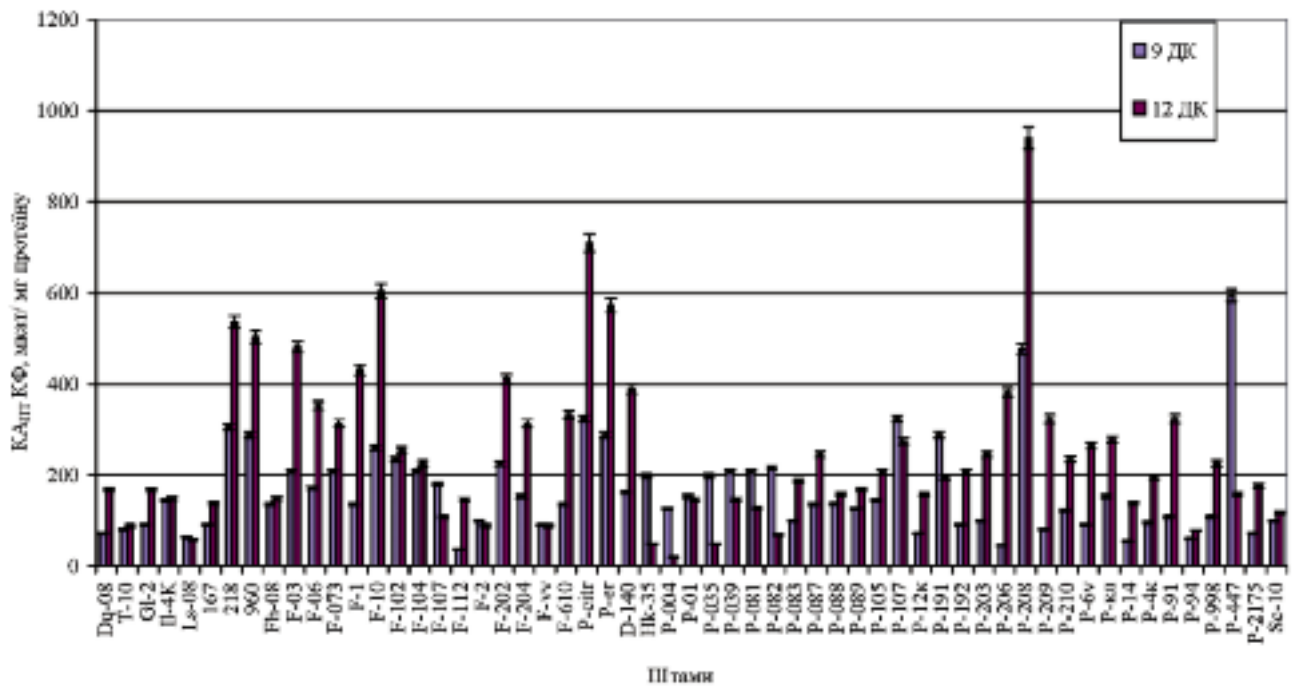


Рис. 3. Питома каталазна активність культурального фільтрату штамів базидіоміцетів на 9-ту (9 ДК) і 12-ту (12 ДК) добу культивування

активності серед досліджених базидіоміцетів зафіксовано для штаму *P. ostreatus* P-208 на 12-ту добу росту — 940,0 мкат/мг, що відповідає загальній КА КФ 639,2 мкат/мл.

Лише для 4 штамів — *Fomes fomentarius* T-10, *F. velutipes* F-112, F-2 та F-vv — виявлено вищий рівень КА<sub>ПТ</sub> в міцелії, зокрема, абсолютний максимум активності міцелію штаму *F. velutipes* F-2, зафіксований на 12-ту добу росту, становить 314,9 мкат/мг і відповідає загальній КА 765,4 мкат/г. Така специфіка активності цих штамів, імовірно, пояснюється зосередженням катаболічних процесів у клітинах міцелію.

Для порівняння отриманих даних зазначимо, що загальна КА сироватки крові тварин — одного з джерел промислового отримання

ензиму каталази — становить від 16,8 до 166,6 мкат/л.

Таким чином, проведені дослідження дали змогу встановити динаміку росту і каталазної активності 57 штамів 12 видів базидіальних грибів. На основі одержаних результатів відібрано культури *F. velutipes* F-2 та *P. ostreatus* P-208, що здатні до підвищеного синтезу цього ензиму і накопичення його в міцелії та культуральній рідині відповідно. Після оптимізації умов культивування низку біосинтетично активних штамів, зокрема штам *P. ostreatus* P-208, можна використовувати у біотехнології як продуцент екстрацелюлярної каталази.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Мирошниченко О. С. Биогенез, физиологическая роль и свойства каталазы // Биополимеры и клетка. — 1992. — Т. 8, № 6. — С. 3–25.
2. Стручкова И. В., Лазарева Е. С., Смирнов В. Ф. Амилазная и оксидоредуктазная активность микодеструктора *Aspergillus terreus* при его росте на новых полимерных материалах // Вест. Нижегородск. ун-та им. Н. И. Лобачевского. — 2010. — № 2 (2). — С. 591–595.
3. Amorim A. M. The application of catalase for the elimination of hydrogen peroxide residues after bleaching of cotton fabrics // Ann. Brasil. Acad. Sci. — 2002. — V. 74, N 3. — P. 433–436.
4. Еремин А. Н. Кинетическая характеристика внеклеточных каталаз грибов *Penicillium piceum* F-648 и их вариантов, адаптированных к пероксиду водорода // Прикл. биохим. микробиол. — 2002. — Т. 38, № 4. — С. 374–380.
5. Гесслер Н. Н., Соколов А. В., Быховский В. Я., Белозерская Т. А. Активность супероксиддисмутазы и каталазы у каратиноидсинтезирующих грибов *Blakeslea trispora* и *Neurospora crassa* в условиях окислительного стресса // Там же. — 2002. — Т. 38, № 3. — С. 237–242.
6. Буценко Л. М., Пенчук Ю. М., Пирог Т. П. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: Навч. посіб. — К.: НУХТ, 2010. — 323 с.
7. Лобанок А. Г. Биотехнология микробных энзимов // Наука и инновации. — 2011. — № 1 (95). — С. 66–69.
8. Михайлова Р. В., Осока О. М., Лобанок А. Г. Образование внеклеточной каталазы видами рода *Penicillium* // Микол. фитопатол. — 2001. — Т. 35. — Вып. 3. — С. 43–46.
9. Fraaije M., Roubroeks H. P., Hagen W. R. et al. Purification and characterization of an intracellular catalase-peroxidase from *Penicillium simplicissimum* // Eur. J. Biochem. — 1996. — V. 235. — P. 192–198.
10. Kurakov A. V., Kupletskaya M. B., Skrynnikova E. V., Somova N. G. Search for micromycetes producing extracellular catalase and study of conditions of catalase synthesis // Appl. Biochem. Microbiol. — 2001. — V. 37, N 1. — P. 59–64.
11. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: Підручн. — К.: НУХТ, 2009. — 336 с.
12. Fedotov O. V. Wood-destroying fungi as bio-sources of ferments for medicinal and nutritional purposes / Plant and Microbial Enzymes: isolation, characterization and biotechnology applications. — Tbilisi: Myza, 2007. — P. 125–126.
13. Kirk P. M., Cannon P. F., David J. C., Stalpers J. A. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi. 9th ed. — Wallingford, CAB International, 2001. — 655 p.
14. Пат. 39243 А UA, МПК 7C12N9/58. Спосіб визначення каталазної активності базидіоміцетів / Федотов О. В., Гавриленко Г. В. — Заявл. 21.11.2000; Опубл. 15.06.2001, Бюл. № 5.
15. Мусиенко М. М., Паршикова Т. В., Славный П. С. Спектрофотометрические методы в практике физиологии, биохимии и экологии растений — К.: Фитосоцицентр, 2001. — 200 с.
16. Государственная Фармакопея СССР. — XI изд. — Вып. 1. — М.: Медицина, 1987. — 336 с.
17. Приседський Ю. Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів. — Донецьк: Кассіопея, 1999. — 210 с.

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА  
БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ —  
ПРОДУЦЕНТОВ КАТАЛАЗЫ**

*Т. Е. Волошко  
О. В. Федотов*

Донецкий национальный университет,  
Украина

*E-mail: bio.graff@yandex.ua*

Исследовали динамику роста и каталазную активность штаммов базидиомицетов при их поверхностном культивировании на глюкозо-пептонной среде. Объектами исследования были 57 штаммов, 5 из которых относятся к 5 видам порядка *Polyporales*, а 52 — к 7 видам порядка *Agaricales*. С целью изучения динамики роста использовали весовой метод определения накопления абсолютно сухой биомассы. Каталазную активность и содержание протеина в мицелии и культуральном фильтрате определяли спектрофотометрически и на основе полученных данных рассчитывали удельную каталазную активность. Установлены уровни накопления биомассы и каталазной активности исследованных штаммов на 9-е и 12-е сутки культивирования, а также способность большинства грибов к синтезу преимущественно внеклеточной каталазы. Результаты исследования позволили отобрать штаммы — активные продуценты каталазы, в частности *F. velutipes* F-2 и *P. ostreatus* P-208, которые являются перспективными для использования в биотехнологии получения препаратов энзимов.

**Ключевые слова:** базидиомицеты, каталазная активность.

**COMPARATIVE CHARACTERISTICS  
OF BASIDIOMYCETES — PRODUCERS  
OF CATALASE**

*T. E. Voloshko  
O. V. Fedotov*

Donetsk National University,  
Ukraine

*E-mail: bio.graff@yandex.ua*

The dynamics of growth and catalase activity of 57 strains of basidiomycetes were investigated. Glucose-peptone medium was used for surface cultivation of fungi. The objects of study were 57 strains, 5 of which belongs to 5 species of the order *Polyporales*, and others do to 7 species of the order *Agaricales*. The weight measurement to estimate accumulation of absolutely dry biomass was used to study growth rates. The spectrophotometric methods were used for determination of catalase activity and protein content in mycelium and culture filtrate. The specific catalase activity was calculated based on this data. The levels of biomass accumulation and catalase activity of the strains on the 9-th and 12-th days of cultivation and ability of the most fungi to synthesize mainly extracellular catalase were determined. Individual variability of the strains was shown. The results allowed selecting the strains — active producers of catalase, including *F. velutipes* F-2 and *P. ostreatus* R-208, which are perspective for use in biotechnology of enzyme preparations.

**Key words:** basidiomycetes, catalase activity.



УДК 619:616.98:577.2

## ВИЯВЛЕННЯ АНТИТІЛ ДО ЗБУДНИКА ВІРУСНОЇ ДІАРЕЇ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

І. В. Горайчук  
В. І. Болотін  
А. П. Герілович  
О. С. Солодянкін  
Р. О. Кучерявенко  
В. В. Кучерявенко

Національний науковий центр  
«Інститут експериментальної та клінічної ветеринарної медицини»,  
Харків, Україна

E-mail: goraiчук@ukr.net

Отримано 13.03.2013

Вірусна діарея великої рогатої худоби — поширене контагіозне захворювання, яке має широкий спектр клінічних симптомів у свійських та диких жуйних тварин і завдає значних економічних збитків сільському господарству. Вірус уражує різні вікові групи тварин і спричинює як імуносупресію, так і розлади репродуктивної, респіраторної та травної систем. Персистентно інфікована худоба є постійним джерелом виділення вірусу, а отже і основним чинником передачі захворювання між сприйнятливими тваринами. У статті наведено порівняльні результати дослідження наявності антитіл за допомогою двох методів — імуноензимного аналізу та реакції нейтралізації вірусів. У ході виконання роботи було відібрано й досліджено 1 010 зразків сироваток крові великої рогатої худоби із трьох господарств Харківської області. Присутність антитіл до збудника вірусної діареї було встановлено за допомогою імуноензимного аналізу в 704 зразках (69,7%) із використанням комерційного набору та в 690 зразках (68,3%) — методом *in house*. Після уточнення результатів з використанням реакції нейтралізації вірусів антитіла до вірусу діареї великої рогатої худоби виявлено в 712 зразках (70,5%). Імуноензимний аналіз рекомендовано для проведення масового скринінгу поголів'я великої рогатої худоби щодо наявності вірусу діареї. Отримані дані підтверджують, що чутливість імуноензимного аналізу задовольняє потребам діагностичних методів. Використання реакції нейтралізації вірусів, як «золотого стандарту» серед серологічних методів, є доцільним для уточнення результатів імуноензимного аналізу. З огляду на наявність в отриманих даних значної кількості хибнопозитивних результатів слід проводити комплексні дослідження із застосуванням як серологічних, так і молекулярно-генетичних методів.

**Ключові слова:** вірусна діарея великої рогатої худоби, сироватка крові, імуноензимний аналіз.

Збудник вірусної діареї великої рогатої худоби (ВД ВРХ) — це одноланцюговий з позитивною полярністю РНК-вмісний вірус діаметром 40–60 нм [1]. Він є представником роду *Pestivirus* родини *Flaviviridae* [2]. Збудники ВД ВРХ зазвичай поділяють на два генотипи, а кожен генотип — на цитопатичний та нецитопатичний біотипи.

Збудники діареї ВРХ спричинюють пригнічення імунітету та розлади репродуктивної, травної і респіраторної систем. Перебіг захворювання супроводжується як субклінічними, так і геморагічними формами [3]. Інфікування нецитопатогенним біотипом вірусу діареї корів на ранніх термінах вагітності може призвести до народження персистентно інфікованих (ПІ) телят [4]. Такі телята є основним джерелом збудника ВД ВРХ [5].

Антиген збудника ВД ВРХ у ПІ тварин трапляється в епітеліальних клітинах усіх слизових оболонок, а отже вірус постійно потрапляє у навколишнє середовище разом із сечею, екскрементами, спермою, секретарми слизових оболонок очей і носа, плодовими водами та оболонками під час абортів [6]. Зараження ПІ тварин цитопатогенним біотипом вірусу діареї ВРХ може спричинити розвиток системних уражень слизових оболонок, що призводить до інтоксикації та летальних наслідків [7].

Як правило, коли захворювання набуває стаціонарного характеру, серед поголів'я ВРХ виявляють близько 1% ПІ та 60% серопозитивних тварин [8, 9]. Телята, народжені від серопозитивних корів, одержують разом із молозивом антитіла до вірусу діареї ВРХ [10]. Титр цих антитіл із часом знижується,

і телята стають сприйнятливими до інфекції. Частіше саме старі тварини стають серопозитивними унаслідок тривалого проміжку часу, протягом якого вони утримувались у безпосередній близькості до III тварин.

Здатність антитіл до нейтралізації ВД ВРХ залежить як від штаму вірусу, так і від кількості та ізотипів антитіл, що виробляються. Непрямим показником наявності збудника ВД ВРХ є виявлення вірус-специфічних антитіл у сироватці крові тварин. Існує багато методів для виявлення антитіл до ВД ВРХ: реакція нейтралізації вірусів (РН), реакція імуофлюоресценції (РІФ) та імуоензимний аналіз (ІЕА) [11, 12]. Реакцію нейтралізації вірусів, також відому як сироваткова нейтралізація, вважають «золотим стандартом» серед методів виявлення антитіл до збудника ВД ВРХ і використовують у всьому світі [13].

Попри вакцинацію, ВД ВРХ завдає значних збитків сільському господарству. Деякі країни Європейського Союзу розробляють і впроваджують програми контролю та знищення (ерадикації) ВД ВРХ, першим кроком яких є виявлення й вилучення зі стада III тварин. Проте вибираючи ефективний метод виявлення збудника ВД ВРХ, слід враховувати антигенну та генетичну варіабельність вірусу, зміну вірусного навантаження, а також вплив материнських антитіл.

Тому з метою підбору оптимального підходу дослідження було зосереджено на порівняльному виявленні антитіл до ВД ВРХ у господарствах Харківської області за допомогою двох методів — імуоензимного аналізу та реакції нейтралізації вірусів.

## Матеріали і методи

### Сироватка крові

Для проведення досліджень нами було відібрано 1 010 зразків сироватки крові ВРХ з трьох господарств Харківської області. В усіх господарствах зразки периферичної крові брали від тварин різних вікових груп, враховуючи їх співвідношення у стаді. Сироватку крові отримували за загальноприйнятою методикою. Зразки зберігали за температури 4 °С до початку досліджень методом ІЕА, а потім — при -70 °С з метою тривалого зберігання для проведення ІЕА та реакції нейтралізації.

### ІЕА виявлення антитіл до ВД ВРХ

Антитіла до ВД ВРХ виявляли за допомогою комерційного набору BVDV Antibody Test Kit (Herd Check, IDEXX, Швейцарія),

в якому на поверхню лунок мікротитрувальних плашок вже було нанесено антигени збудника ВД ВРХ. Під час проведення ІЕА до кожної лунки полістиролового планшета вносили 100 мкл розчинника та 25 мкл проби. Оптичну густину зразків визначали на фотометрі iMark (Bio-Rad, США) за довжини хвилі 450 нм. Наявність чи відсутність антитіл до вірусу в досліджуваних зразках оцінювали за значенням коефіцієнта оптичного поглинання  $S/P$  таким чином:

$$S/P = \frac{\text{Sample } A_{450} - NC_x A_{450}}{PC_x A_{450} - NC_x A_{450}},$$

де:  $NC_x$  — негативний контроль;

$PC_x$  — позитивний контроль.

Позитивними вважали зразки, коефіцієнт оптичного поглинання  $S/P$  яких був більший за 0,30, негативними — зразки з коефіцієнтом оптичного поглинання нижче 0,20.

### Метод ІЕА in house

Отримання антигену, його іммобілізацію та ІЕА проводили згідно з методом *in house*, розробленим у Національній референс-лабораторії вірусології Ветеринарного університету м. Берн (Швейцарія) [14]. Розчин антигенів вносили у полістиролові 96-луночні планшети PolySorb (Nunc, Данія). Інактивовані сироватки крові та антивидовий кон'югат Goatanti-BovineIgG(H+L)-PO розчиняли в 1%-му розчині сухого молока. Оптичну щільність визначали за довжини хвилі 405 нм в аналізаторі SUNRISE (Tecan, Німеччина).

### Реакція нейтралізації вірусів

Реакцію нейтралізації проводили у разі отримання різних результатів обох ІЕА з використанням плоскодонних 96-луночних мікропланшетів фірми TPP (Німеччина) за методом Steck [15]. Сироватки крові прогрівали за температури 56 °С протягом 30 хв з метою інактивації неспецифічних інгібіторів, таких як комплемент, що реагують з мультімоллекулярними імунними комплексами. Потім готували двократні розведення кожного зразка від 1:4 до 1:512 на живильному середовищі МЕМ, в які додавали в рівних об'ємах (по 50 мкл) 100 ТЦД<sub>50</sub> ВД ВРХ (R1935/72-AG-03/06) та інкубували упродовж 1 год за температури 37 °С в умовах 5% CO<sub>2</sub>. У кожну лунку вносили 100 мкл суспензії культури клітин назального епітелію ембріона теляти (ЕКaNaEp), яку культивували за методикою Canal [14], у концентрації 3·10<sup>5</sup> кл/мл та інкубували за тих самих

умов протягом 78 год. Облік реакції враховували за інфекції вірусу (зміни моношару, що супроводжувалася загибеллю клітин унаслідок репродукції в них вірусу) у контрольних лунках з інфікованою культурою клітин без сироватки крові за допомогою мікроскопа. Титру віруснейтралізуючих антитіл відповідало останнє розведення сироватки, що запобігало розвитку цитопатогенної дії 50% моношару клітин.

#### Статистичні методи

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою комп'ютерної програми NCSS 07.1.21 statistical software (NCSS, LLC, США), в якій порівнювали результати за чутливістю, специфічністю та охопленням діагностичних методів згідно з методиками порівняння результатів серологічних тестів [16]:

чутливість тесту ( $Se$ ) — частота позитивних результатів методу ІЕА стосовно позитивних результатів РН:

$$Se = \frac{\text{позитивні результати ІЕА} - \text{хибнопозитивні результати ІЕА}}{\text{позитивні результати РН}}$$

хибнонегативні результати (FN) — частота негативних результатів ІЕА, які є позитивними в реакції РН:

$$FN = \frac{\text{негативні результати ІЕА}}{\text{позитивні результати РН}}$$

охоплення діагностичних методів ( $Ct$ ) — кількість випадків з однаковими результатами у двох методах ІЕА до загальної кількості досліджених зразків:

$$Ct = \frac{\text{позитивні результати обох методів} + \text{негативні результати обох методів}}{\text{кількість досліджених зразків}}$$

#### Результати та обговорення

На першому етапі досліджень із 1 010 зразків сироватки крові ВРХ методом ІЕА з використанням комерційного набору BVDV Antibody Test Kit (Herd Check, IDEXX, Швейцарія) антитіла до збудника ВД ВРХ було виявлено в 704 зразках (69,7%). Із них у першому господарстві виявлено 56 позитивних зразків (20,6%) із 272, у другому — 394 (87%) із 453 та в третьому — 254 (89,1%) із 285.

Далі всі відібрані зразки сироватки крові ВРХ досліджували із застосуванням методу *in house*. Наявність антитіл до ВД ВРХ було встановлено у 690 зразках сироватки крові (68,3%) із 1 010. З них у першому господарстві виявили 9 позитивних зразків (3,3%),

у другому — 429 (94,7%) і в третьому — 252 (88,4%).

У разі проведення ІЕА двома різними методами розбіжність в отриманих результатах становила близько 1,4%. Саме ці зразки були додатково досліджені в реакції нейтралізації, після проведення якої наявність антитіл до збудника ВД ВРХ підтверджено в 712 зразках (70,5%) із 1 010 ( $P \leq 005$ ). З них у першому господарстві було виявлено 10 позитивних зразків (3,7%), у другому — 428 (94,5%) і в третьому — 274 (96,1%) (таблиця).

За результатами проведених досліджень

#### Результати серологічних досліджень зразків сироватки крові ВРХ щодо вірусної діареї ( $n = 1 010$ )

Номер господарства	ІЕА IDEXX		ІЕА Швейцарія		Позитивні зразки з урахуванням реакції нейтралізації вірусу, %
	Позитивні зразки, %	Хибно-позитивні, %	Позитивні зразки, %	Хибно-позитивні, %	
1	20,6	16,9	3,3	0,4	3,7
2	87	0,2	94,7	0,9	94,5
3	89,1	0,4	88,4	0	96,1

було встановлено значну розбіжність хибно-позитивних зразків з першого господарства з використанням ІЕА IDEXX, а саме 16,9% порівняно з результатами, отриманими в дослідженні зразків з інших господарств, що становило менше 1% ( $P \leq 005$ ). На наш погляд, це може бути пов'язано з перехресною реакцією до інших пестивірусів, зокрема до збудника прикордонної хвороби овечь, що було визначено також у роботах інших дослідників [17, 18]. На цій підставі результати дослідження зразків від тварин з першого господарства, отримані за допомогою комерційного набору IDEXX, є статистично недостовірними ( $P \leq 005$ ), тому не враховуватимуться в подальших розрахунках чутливості реакцій.

Порівняння одержаних результатів серологічних досліджень зразків із трьох господарств обома методами ІЕА з урахуванням хибнопозитивних зразків з результатами реакції нейтралізації вірусів показало, що чутливість реакції нейтралізації вірусів значно вища, що відповідає «золотому стандарту» серед методів виявлення антитіл за

наявності в поголів'ї серопревалентності або сероконверсії.

Порівняно з реакцією нейтралізації вірусів чутливість комерційного набору IDEXX становила 92,3%, а методики, розробленої у Ветеринарному університеті м. Берн — 96,5%. Кількість хибнонегативних результатів — 7,7% для комерційного набору та 3,5% — для *in house* методики — ( $P \leq 005$ ). Охоплення випробуваних методів ІЕА досягло 86,1%.

Отже, за результатами серологічних досліджень 1 010 зразків сироваток крові ВРХ з трьох господарств Харківської області було виявлено антитіла до збудника ВД ВРХ у 712 (70,5%) зразках, що свідчить про значне поширення захворювання на цій території. Також було визначено чутливість

комерційного набору IDEXX та *in house* методики Ветеринарного університету м. Берн, яка становила 92,3% та 96,5% відповідно, що задовольняє діагностичні потреби для масового скринінгу поголів'я щодо наявності збудника ВД ВРХ. Враховуючи трудомісткість та часозатратність реакції нейтралізації вірусів, цей метод є більш доцільним для підтвердження позитивних результатів, отриманих за допомогою ІЕА. Задля ефективного контролю розповсюдження ВД ВРХ та уникнення хибнопозитивних зразків у разі використання серологічних методів досліджень є потреба в удосконаленні підходів щодо моніторингу інфекції при залученні комплексу серологічних та молекулярно-генетичних методів.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Krey T., Thiel H.-J., Rummenapp T. Acid-Resistant Bovine Pestivirus Requires Activation for pH-Triggered Fusion during Entry // *J. Virol.* — 2005. — V. 79, N 7. — P. 4191–4200.
2. Heinz F., Collett M., Purcell R. et al. Family Flaviviridae. Virus taxonomy // *Abst. 7th Int. Commit. Taxonomy Viruses, San Diego, USA, 2000.* — P. 859–878.
3. Grooms D., Baker J., Ames T. Diseases caused by bovine virus diarrhoea virus / *Large Animal Internal Medicine.* — St. Louis: Mosby, 2002. — P. 707–714.
4. Peterhans E., Bachofen C., Stalder H. P., Schweizer M. Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction // *Vet. Res.* — 2010. — V. 41, N 6. — P. 44–58.
5. Mudry M., Meylan M., Regula G. et al. Epidemiological Study of Pestiviruses in South American Camelids in Switzerland // *J. Vet. Intern. Med.* — 2010. — V. 24. — P. 1218–1223.
6. Fulton R., Whitley E., Johnson B. et al. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in persistently infected cattle and BVDV subtypes in affected cattle in beef herds in south central United States // *Can. J. Vet. Res.* — 2009. — V. 73. — P. 283–291.
7. Perler L., Schweizer M., Jungi T. et al. Bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus-1 prime uninfected macrophages for lipopolysaccharide-triggered apoptosis by interferon-dependent and -independent pathways // *J. Gen. Virol.* — 2000. — V. 81. — P. 881–887.
8. Houe H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections // *Vet. Microbiol.* — 1999. — V. 64. — P. 89–106.
9. Hessman B., Fulton R., Sjeklocha D. et al. Evaluation of economic effects and the health and performance of the general cattle population after exposure to cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus in a starter feedlot // *Am. J. Vet. Res.* — 2009. — V. 70. — P. 73–85.
10. Endsley J., Ridpath J., Neill J. Induction of T lymphocytes specific for bovine viral diarrhoea virus in calves with maternal antibody // *Viral Immunol.* — 2004. — V. 17, N 1. — P. 13–23.
11. Saliki J., Dubovi E. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections // *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* — 2004. — V. 20, N 1. — P. 69–83.
12. Sandvik T. Selection and use of laboratory diagnostic assays in BVD control programmes // *Vet. Microbiol.* — 2005. — V. 72. — P. 3–16.
13. Fulton R. Vaccines / *Bovine Viral Diarrhoea Virus. Diagnosis, Management, and Control.* — Iowa: Blackwell, 2005. — P. 197–208.
14. Canal C. W., Strasser M., Hertig C. et al. Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil // *Vet. Microbiol.* — 1998. — V. 63, N 2–4. — P. 85–97.
15. Steck F., Lazary S., Fey H. et al. Immune responsiveness in cattle fatally affected by bovine virus diarrhoea-mucosal disease // *Zbl. Vet. Med.* — 1980. — V. 27. — P. 429–445.
16. Courtney C., Cornell J. Evaluation of heartworm immunodiagnostic tests // *J. Am. Vet. Med. Assoc.* — 1990. — V. 197, N 6. — P. 724–729.
17. Braun U., Bachofen C., Buchi R. et al. Infection of cattle with Border disease virus by sheep on communal alpine pastures // *Schweiz Arch. Tierheilkd.* — 2013. — V. 155, N 2. — P. 123–128.
18. Cranwell M. P., Otter A., Errington J. et al. Detection of Border disease virus in cattle // *Vet. Rec.* — 2007. — V. 161, N 6. — P. 211–212.



**ОБНАРУЖЕНИЕ АНТИТЕЛ  
К ВОЗБУДИТЕЛЮ ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ  
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

*И. В. Горайчук, В. И. Болотин,  
А. П. Герилевич, А. С. Солодянкин,  
Р. А. Кучерявенко, В. В. Кучерявенко*

Национальный научный центр  
«Институт экспериментальной и клинической  
ветеринарной медицины», Харьков, Украина

*E-mail: goraichuk@ukr.net*

Вирусная диарея крупного рогатого скота — распространенное контагиозное заболевание, которое имеет широкий спектр клинических симптомов у домашних и диких жвачных животных и причиняет значительные экономические убытки сельскому хозяйству. Вирус поражает разные возрастные группы животных и вызывает как иммуносупрессию, так и расстройства репродуктивной, респираторной и пищеварительной систем. Персистентно инфицированный скот является постоянным источником распространения вируса, а следовательно, основным фактором передачи заболевания между восприимчивыми животными. В статье приведены сравнительные результаты исследования наличия антител с помощью двух методов — иммуноэнзимного анализа и реакции нейтрализации вирусов. В ходе выполнения работы было отобрано и исследовано 1 010 образцов сывороток крови крупного рогатого скота из трех хозяйств Харьковской области. Присутствие антител к возбудителю вирусной диареи было установлено иммуноэнзимным анализом в 704 образцах (69,7%) с использованием коммерческого набора и в 690 образцах (68,3%) — методом *in house*. После уточнения результатов с помощью реакции нейтрализации вирусов наличие антител к вирусу диареи крупного рогатого скота было установлено в 712 образцах (70,5%). Иммуноэнзимный анализ рекомендован для проведения массового скрининга поголовья крупного рогатого скота на наличие вируса диареи. Полученные данные подтверждают, что чувствительность иммуноэнзимного анализа удовлетворяет требованиям, предъявляемым к диагностическим методам. Использование реакции нейтрализации вирусов, как «золотого стандарта» среди серологических методов, целесообразно для уточнения результатов иммуноэнзимного анализа. Учитывая значительное количество ложноположительных результатов, необходимо проводить комплексные исследования с применением как серологических, так и молекулярно-генетических методов.

**Ключевые слова:** вирусная диарея крупного рогатого скота, сыворотка крови, иммуноэнзимный анализ.

**DETECTION  
OF THE BOVINE VIRAL DIARRHEA  
ANTIBODIES**

*I. V. Goraichuk, V. I. Bolotin,  
A. P. Gerilovich, O. S. Solodyankin,  
R. O. Kucheryavenko, V. V. Kucheryavenko*

National Scientific Centre  
«Institute of Experimental and Clinical  
Veterinary Medicine»,  
Kharkiv, Ukraine

*E-mail: goraichuk@ukr.net*

Bovine viral diarrhoea is a widespread infection of cattle that has a wide range of clinical symptoms in domestic and wild ruminants. It is a major problem in cattle and causes significant economic losses in the cattle industry. The virus infects bovines of all ages and causes both immunosuppression and reproductive, respiratory and digestive disorders. Persistently infected cattle are the main factor in transmission of the disease between and among herds. Comparative results of antibodies presence received by two methods of enzyme immunoassay and virus neutralization test are given in the paper. During the work, 1010 samples of blood serum of cattle from three farms in the Kharkiv region were selected and analyzed. Bovine viral diarrhoea virus concerning antibodies were found by enzyme immunoassay in 704 samples (69.7%) using commercial kit and in 690 samples (68.3%) using *in house* method. After results clarification by virus neutralization test, bovine viral diarrhoea antibodies were found in 712 samples (70.5%). Immunoenzyme analysis is recommended for mass screening of cattle for viral diarrhoea occurrence. The results confirm that the sensitivity immunoenzyme analysis satisfies the requirements of the diagnostic methods. Using the neutralization reaction of viruses as the «gold standard» of serological methods, it is appropriate to clarify the results of immunoenzyme analysis. Since the results contain a significant number of false positive results, it is necessary to carry out comprehensive studies using both serological and molecular genetics methods.

**Key words:** viral diarrhoea of bovine animals, serum, enzyme immunoassay.



## ДЕЯКІ БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ГРИБА *Cordyceps militaris* (L.: Fr.) Fr. (Ascomycota) ЯК ПРОДУЦЕНТА ЛІКАРСЬКИХ РЕЧОВИН

О. Б. Михайлова  
Н. Л. Поєдинок

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, Київ

E-mail: mikhajlov\_e@ukr.net

Отримано 26.02.2013

Наведено результати дослідження росту і морфологічних особливостей культур лікарського гриба *Cordyceps militaris* із колекції Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України. Методом сканувальної електронної мікроскопії досліджено характерні для *C. militaris* мікроморфологічні структури вегетативного міцелію. Морфолого-культуральні дослідження проводили на чотирьох агаризованих живильних середовищах. Для всіх досліджених штамів оптимальними для вегетативного росту були глюкозо-пептон-дріжджовий агар і мальц-екстракт агар, температура інкубації — 16 °С, критична температура — 36 °С. Оптимальними джерелами вуглецю для вегетативного росту міцелію були глюкоза, лактоза і сахароза, серед органічних джерел азоту — пептон і дріжджовий екстракт, рН 6,0–6,5. Опромінення світлом різної природи стимулювало швидкість радіального росту гриба на агаризованих та накопичення біомаси — на рідких живильних середовищах.

**Ключові слова:** *Cordyceps militaris*, сканувальна електронна мікроскопія, ріст, морфологія, температура інкубації, джерела вуглецю та азоту, рН, міцеліальна маса.

Пошук нових природних джерел фізіологічно активних сполук з метою одержання ефективних та безпечних біопрепаратів є однією з важливих задач сучасної біотехнології. В останні три десятиріччя у фармацевтичній промисловості відбулися зміни, пов'язані з розвитком біотехнології. Серед лікарських препаратів значну увагу почали привертати засоби, отримані біотехнологічним способом на основі грибної біомаси. Особливістю цих біотехнологій було те, що як продуценти частіше стали використовувати макроміцети, особливо *Basidiomycota* та *Ascomycota*, і основне місце серед препаратів із грибів посідали вже не антибіотики, а серцево-судинні, протиракові, імуностимулювальні, гепатопротекторні лікарські засоби і харчові добавки на основі біологічно активних речовин (БАР) грибного міцелію. Відомі тривалий час лише вузькому колу мікологів-систематиків ентомопатогенні гриби роду *Cordyceps* Fr. тепер у багатьох країнах опинились у центрі уваги біотехнологів. Найвідомішим видом цього роду, що має практичне значення, є *Cordyceps militaris* (L.: Fr.) Fr. Цей гриб може уражувати комах у різних фазах розвитку, але, як правило, він паразитує на лялечках та гусеницях лускокрилих (Lepidoptera) [1, 2].

Лікувальні властивості речовин, одержаних із видів роду *Cordyceps*, відомі вже понад 2 000 років і їх широко застосовують у традиційній китайській та тибетській медицині [3, 4]. Сучасними дослідженнями доведено, що окремі види роду *Cordyceps* здатні синтезувати цілу низку БАР [5–7]. Особливу роль серед них відіграють полісахариди — D-глюкани, галактозоаміноглюкани та інші сполуки, наприклад кордицепін [8]. Ці сполуки активізують імунні клітини організму людини, які збільшують продукцію цитокінів та інтерферону, підсилюють резистентність до різних патогенних мікроорганізмів, підвищують адаптаційні можливості організму, мають антиоксидантну активність і перешкоджають процесам старіння [5, 9]. Встановлено, що препарати з кордицепсу, як й інші полісахариди грибів, що входять до їхнього складу, зменшують негативну дію хемо- та та радіотерапії.

Вузька специфічність субстратів, сезонність, особливість традиційних регіонів зростання і збору цих грибів визначають надзвичайно високу ціну їх на світовому ринку (понад 1 тис. дол. США за 1 кг плодівих тіл). Саме тому актуальним є розроблення високоефективних біотехнологій культивування на штучних субстратах, що дасть

змогу зменшити вартість відповідних сполук і зробити їх доступними для широких верств населення.

Одним із методів промислового культивування *Cordyceps militaris* є одержання плодових тіл твердофазовим культивуванням з подальшим виділенням та очищенням певних цільових речовин. Але більш технологічним та ефективним є спосіб одержання грибною біомаси і метаболітів *C. militaris* на рідких живильних середовищах в умовах глибинної культури, що уможливило одержання за короткий час необхідних речовин із заданими властивостями [3, 10–12].

Біотехнологічне використання *C. militaris* як потенційного продуцента БАР із різними біологічними властивостями стало можливим лише з уведенням його в чисту культуру. Проте дані щодо особливостей росту і розвитку в чистій культурі обмежені, а іноді й суперечливі. Під час культивування грибів у вегетативній формі одним із важливих етапів є їх коректна ідентифікація та контроль чистоти культури-продуцента за характерними мікроморфологічними і культуральними ознаками. Саме тому є потреба в подальшому детальному вивченні анаморф і структур вегетативного міцелію, основних морфологічних і культуральних ознак за вирощування в різних умовах культивування, що дає змогу за певними морфологічними ознаками охарактеризувати та ідентифікувати цей вид у культурі.

Метою роботи було дослідження біологічних властивостей *C. militaris* у культурі, зокрема мікроморфології вегетативного міцелію, особливостей росту і розвитку на живильних середовищах різного складу, а також інших факторів росту та біосинтетичної активності штамів *C. militaris*.

### Матеріали і методи

Об'єктами дослідження були чисті культури *C. militaris* (2 штами), які зберігаються в Колекції культур шапинкових грибів (ІВК) Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України [13].

Дослідження морфології та росту культур проводили на стандартних і модифікованих агаризованих живильних середовищах різного складу: мальц-екстракт агар (МЕА), сусло-агар (4° за Балінгом) (СА), картопляно-декстрозний агар DIFCO (КДА), глюкозо-пептон-дріжджовий агар (ГПДА), г/л: глюкоза — 25,0; пептон — 5,0; дріжджовий екстракт — 3,0; агар-агар — 20, рН 6,5, у чашках Петрі. Поверхневе культивування

здійснювали за температур: 4,0±0,1; 16±0,1; 26,0±0,1 °С. Для перевірки життєздатності культур їх інкубували на ГПДА за температур 30–38 °С з інтервалом 1 °С. Після третьої доби інкубації враховували наявність чи відсутність росту міцелію. Збереження або втрату життєздатності міцелію культур перевіряли у процесі подальшого інкубування за температури 26 °С.

Радіальну швидкість росту розраховували за методикою [14].

Мікроструктури вегетативного міцелію *C. militaris* досліджували в світловому мікроскопі МБІ-15, а також у сканувальному електронному мікроскопі SEM JSM-35С (Японія), використовуючи модифікований метод Квательбаума та Карнера [15].

Наявність у вегетативному міцелії досліджених штамів грибів оксидаз (лакази, тирозинази, пероксидази) встановлювали за допомогою якісних ензиматичних реакцій на наявність восьми ензимів, які характеризують метаболізм азотних сполук (протеїнази, уреазі, нітрат-редуктази), вуглеводів (амілази, целюлази, ксиланази, β-глюкозидази), ліпідів (ліпази) за методом [16].

Для визначення впливу кислотності середовища на ріст міцелію використовували рідке синтетичне середовище А такого складу (г/л): глюкоза — 20,0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> — 4,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> — 1,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O — 1,0; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O — 0,5; MnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O — 0,005; FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O — 0,005; CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O — 0,003; ZnCl<sub>2</sub> — 0,005. Значення рН у середовищі змінювали в інтервалі від 2 до 8 з кроком 1 за допомогою розчинів 1Н КОН і 1Н НСІ. Початкове значення рН середовища (контроль) визначали після стерилізації.

Потреби культур у джерелах вуглецевого та азотного живлення визначали на синтетичному середовищі А, склад якого наведено вище. Джерелами вуглецю були моно- (глюкоза, ксилоза, маноза), ди- (сахароза, лактоза, мальтоза) і полісахариди (крохмаль), які додавали в кількості, еквівалентній 20 г глюкози за вуглицем, рН 6,5.

Джерелами азоту слугували NaNO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, пептон, дріжджовий екстракт, кукурудзяний екстракт (КЕ), які вносили у середовища в кількості, еквівалентній 4 г (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> за азотом. Дослідження проводили у колбах Ерленмеєра місткістю 150 мл з 50 мл живильного середовища. Інокулюмом були 7-добові культури гриба, попередньо вирощені на ГПДА за температури 16 ± 1 °С. У кожному колбу з рідким середовищем вносили три міцеліальні диски (d = 5 мм). Культури інкубували у стаціонарних умовах

за  $16 \pm 1$  °С. Біомасу відокремлювали від культуральної рідини (КР) шляхом фільтрації, коли в одному з варіантів міцелій повністю покривав поверхню середовища. Кількість біомаси визначали ваговим методом після висушування до сталої маси за температури  $105 \pm 1$  °С [17]. Також вираховували кінцеве значення рН культуральної рідини.

Для визначення кількості екзополісахаридів їх осаджували 10 мл 96%-го етанолу з 5 мл КР. Розчин відстоювали протягом 24 год у холодильнику за температури  $4 \pm 1$  °С. Наступної доби осад відділяли центрифугуванням упродовж 25 хв у режимі 5 000 g. Надосадову рідину зливали, осад розчиняли в 5 мл гарячої дистильованої води. З отриманого розчину відбирали 2 мл рідини, в якій визначали кількість екзополісахаридів фенолсірчанним методом [18].

Експериментальні дослідження впливу світла на культурально-морфологічні особливості продуцентів проводили з використанням експериментальних установок, які забезпечували генерацію лазерного випромінювання із заданими параметрами на довжинах хвиль 450,0 та 632,8 нм з можливостями опромінення культур у розчинах, на агарі тощо. Середня доза випромінювання на мішені становила близько 250 мДж/см<sup>2</sup>.

Статистичну обробку результатів виконували стандартними методами з використанням t-критерію Стьюдента за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel. Усі досліди проводили в 5 повторах. Дані вважали достовірними за  $P \leq 0,05$ .

### Результати та обговорення

Встановлено, що вегетативний міцелій *C. militaris* складається з тонких (2–4 мкм), помірно розгалужених, рівномірно септованих гіф, які зливаються між собою, утворюючи численні міцеліальні тяжі. Досліджені культури на всіх живильних середовищах проходили анаморну стадію (конідіальні спороношення) (рис. 1).

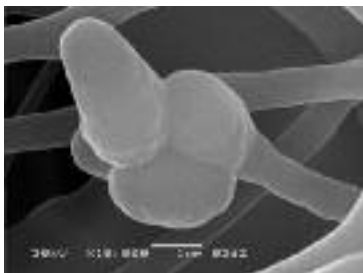


Рис. 1. *Cordyceps militaris*: конідіальне спороношення *Cephalosporium militare*: SEM JSM-35C.  $\times 18\ 000$

Фіаліди конічні, пляшкоподібні,  $10\text{--}30 \times 1,5\text{--}2,3$  мкм, утворюються поодинокі з клітин гіф через різні інтервали або в пучках і групами (часто на різних рівнях) по дві — чотири. Конідії формуються на верхівках фіалід. Перша конідія звичайно більша, еліптична або короткоциліндрична, розміром  $3,2\text{--}6,0 \times 3,0$  мкм у діаметрі, наступні — шароподібні діаметром  $2,3\text{--}3,0$  мкм.

Щодо належності анаморфи *Cordyceps militaris* до того чи іншого роду єдиної думки немає. Доволі тривалий час вважали, що анаморфою *C. militaris* є *Isaria farinose* (Holm.) Fr., проте після виділення цього гриба в чисту культуру Petch [цит. за 2] уперше зробив припущення, що його анаморфа належить до роду *Cephalosporium*. Саме такого висновку дійшов Kobayasi [19], який вивчав цей вид у культурі. Коваль [2] відносить цю конідіальну стадію до *Cephalosporium militare*. У більш пізніх джерелах вона фігурує як *Lecanicillium* sp. [20, 21] або як представник роду *Paecilomyces* [22].

Крюков та ін. [23] відзначають, що ізоляти, отримані з аскоспор *C. militaris*, мали анаморфи, які за своїми морфологічними ознаками повністю збігались із зазначеними в літературі як *Lecanicillium* sp. [20, 21]. Окрім того, у посівах зі стром цього гриба поряд із типовою анаморфою спостерігалася й інша, ознаки якої чітко вкладаються у діагноз виду *Isaria farinose* [23]. Проте асоціація *I. farinose* з *C. militaris* залишається незрозумілою, і цей факт констатують різні дослідники. В умовах нашого експерименту спостерігали лише один вид конідіального спороношення.

Слід також зазначити, що нами встановлено наявність на вегетативному міцелії *C. militaris* численних хламідоспор (рис. 2) і скупчення екзометаболітів (рис. 3).

Таким чином, дослідження мікроморфології вегетативного міцелію культур *C. militaris* з використанням світлової та електронної мікроскопії дало змогу встановити

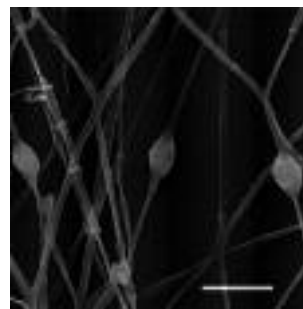


Рис. 2. *Cordyceps militaris*: вегетативний міцелій: хламідоспори, SEM JSM-35C.  $\times 200$

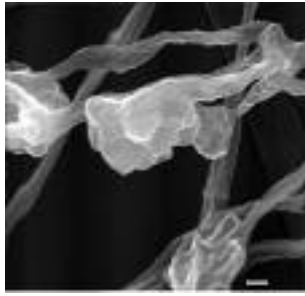


Рис. 3. *Cordyceps militaris*: вегетативний міцелій: екзометаболіти, SEM JSM-35C.  $\times 6\ 000$

наявність у всіх штамів характерних для даного виду мікроструктур (конідіального спороношення, анастомозів, міцеліальних тяжів), які дозволяють ідентифікувати та контролювати чистоту культури продуцентів у процесі їх культивування.

Важливе практичне значення мають дані щодо збереження життєздатності ентомопатогенних грибів в умовах чистої культури. При цьому слід враховувати її трофічні особливості. Було встановлено, що компонентний склад живильних середовищ для цієї групи грибів зумовлений їхніми трофічними особливостями, які відрізняються за специфічними потребами в різних компонентах, спричинюючи перехід від паразитного існування до сапротрофного [1]. За даними літератури, культури *C. militaris* культивуються і зберігаються на стандартних живильних середовищах: мальц-естракт агар (МЕА) і картопляно-декстрозний агар (КДА) [11, 12, 24]. Підбираючи склад живильного середовища, брали до уваги природну приуроченість цього виду до протеїнових субстратів і виходили з того, що середовище має містити протеїни, які легко руйнуються протеолітичними ензимами ентомопатогенних грибів, тимчасом як вуглеводи і жири можуть бути присутні в мінімальній кількості. Тому під час проведення морфолого-культуральних досліджень крім стандартних живильних середовищ (МЕА, КДА) використовували також СА і ГПДА. Оптимальне живильне середовище для росту культур підбирали, враховуючи інтенсивність розвитку вегетативного міцелію, його пігментацію, морфологію колоній, радіальну швидкість росту штамів, а також фізіологічну активність культур. Особливу увагу приділяли дослідженню чинника, що впливає на збереження життєздатності культур, — температурі інкубації.

Культури *C. militaris* на використаних живильних середовищах під час культивування за всіх досліджених температур мали

стабільні характерні морфологічні ознаки, тобто формували дуже щільні, повстисті колонії з великою кількістю сплутаних повітряних гіф, рівним або хвилястим краєм. У темряві формувались колонії білого кольору, за освітлення спостерігали появу яскраво-жовтої пігментації міцелію (рис. 4). Реверзум із чіткими радіальними складками, його колір збігався із кольором середовища.

За результатами дослідження впливу низьких і високих температур на ріст та життєздатність міцелію було встановлено, що за умов низьких температур ( $4\pm 0,1\ ^\circ\text{C}$ ), незалежно від складу середовища, спостерігався слабкий вегетативний ріст (менш ніж  $0,75\ \text{мм/добу}$ ), і міцеліальні колонії зберігали свої основні морфологічні ознаки. Слід зазначити, що досліджені штами незадовільно переносили підвищення температури. За температури  $34\ ^\circ\text{C}$  ріст міцелію був відсутній, однак культури не втрачали життєздатності і відновлювали ріст при  $26\ ^\circ\text{C}$  протягом тижня. Температура  $36\pm 0,1\ ^\circ\text{C}$  виявилася критичною, і штами *C. militaris* повністю втрачали життєздатність. Відомо [24], що загибель клітин міцелію за високих температур є наслідком порушення координації процесу денатурації протеїнів.

Проведене дослідження дало змогу встановити, що найсприятливішими середовищами для росту та розвитку вегетативного міцелію *C. militaris* були ГПДА та МЕА, а оптимальною для росту міцелію досліджених штамів *C. militaris* температурою —  $16\pm 0,1\ ^\circ\text{C}$  (табл. 1).

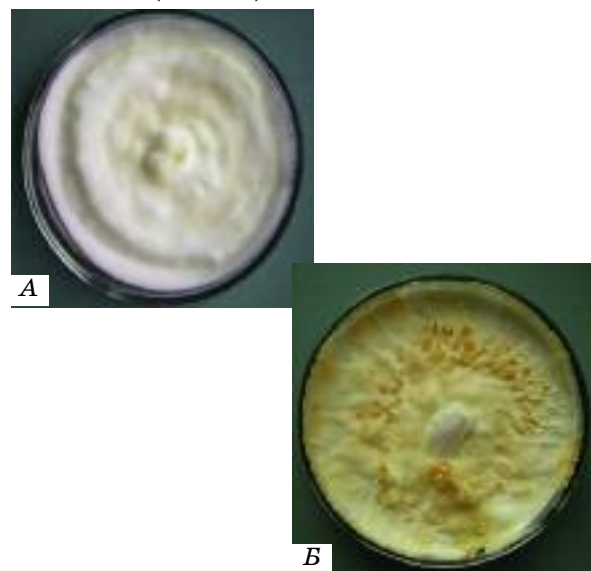


Рис. 4. Міцеліальна колонія *C. militaris* на середовищі ГПДА:

25-та доба культивування за відсутності освітлення (А); при освітленні (Б)



Таблиця 1. Швидкість радіального росту ( $V_r$ , мм/добу) вегетативного міцелію *Cordyceps militaris* на агаризованих середовищах за різних температур інкубації

Вид, штамп	Температура інкубації, °C	$V_r$ , мм/добу на різних живильних середовищах			
		СА	МЕА	ГПДА	КДА
<i>Cordyceps militaris</i> , 1862	16±0,1	1,32±0,6	1,5±0,4	1,83±0,4	1,12±0,2
	26±0,1	1,23±0,2	1,53±0,3	1,61±0,4	1,42±0,6
<i>C. militaris</i> , 2029	16±0,1	1,43±0,2	1,41±0,2	1,45±0,5	0,96±0,2
	26±0,1	1,13±0,4	1,12±0,2	1,21±0,4	1,16±0,3

Примітка: у цій та в наступних таблицях для всіх показників значення достовірні за  $P < 0,05$ .

Згідно з одержаними значеннями радіальної швидкості росту досліджені штами *C. militaris* можна віднести до групи грибів, що ростуть повільно.

Підбір оптимальних субстратів у процесі культивування грибів з метою цілеспрямованого синтезу кінцевих продуктів неможливо проводити без знання їхніх фізіолого-біохімічних властивостей, зокрема активності ензимів. У природі ентомопатогенні гриби здатні синтезувати значну кількість ензимів, з яких найбільше значення мають хітиназа, протеїназа, ліпаза та амілаза [1, 2].

Нами досліджено активність таких гідролітичних ензимів: амілази, целюлази,  $\beta$ -глюкозидази, ксиланази, протеїнази, нітрат-редуктази, уреаз, ліпази у культурах *C. militaris*. У всіх штамів спостерігали позитивні реакції на більшість ензимів, активність яких визначали. Не виявлено наявності ксиланази (табл. 2).

На цьому етапі експериментів у ході проведення первинного скринінгу здійснено дослідження наявності певних ензимів за допомогою якісних тестів (у табл. 2 відображено «+» або «-»), але в подальшому ми плануємо провести кількісні дослідження окремих ензимів у штамів, які

вважаємо біотехнологічно перспективними продуцентами. Проведення кількісних визначень ензиматичної активності всього спектра ензимів — трудомісткий процес і на даному етапі досліджень був недоцільним.

Визначення наявності окисно-відновних ензимів (лакази, тирозинази і пероксидази) показало, що всі досліджені культури виявили позитивну реакцію лише на тирозиназу, реакції на лаказу і пероксидазу не спостерігали.

Таким чином, у біотехнології культивування цієї групи грибів з урахуванням їхніх екологічних та фізіологічних особливостей живлення слід використовувати середовища, які містять джерела протеїнів.

Одним із найважливіших фізико-хімічних параметрів середовища є рН, значення якого впливає на фізіологічну активність культур та продуктивність біотехнологічного процесу. Дослідження впливу середовища на ріст культур показало необхідність визначення оптимальних значень рН для кожного штаму, оскільки це впливає на підвищення продуктивності біотехнологічного процесу. Вираховуючи оптимальне для росту культур значення рН середовища в діапазоні від 2 до 8, встановили, що культури починали рости за рН 3,0 (рис. 5).

 Таблиця 2. Ензиматичні реакції на наявність гідролітичних ензимів у досліджених штамів *Cordyceps militaris*

Вид, штамп	Ензим							
	Протеїназа	Амілаза	Целюлаза	$\beta$ -Глюкозидаза	Ксиланаза	Уреаз	Нітрат-редуктаза	Ліпаза
<i>C. militaris</i> , 1862	+++	++	+	+	-	+	+	++
<i>C. militaris</i> , 2029	+++	++	++	+	-	+	+	++

Примітка: «-» — реакція відсутня; «+» — слабка реакція; «++» — помірна реакція; «+++» — сильна реакція.



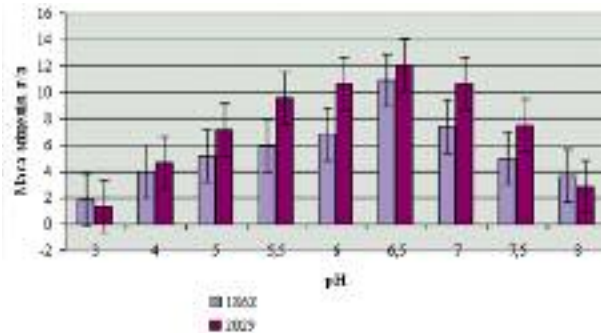


Рис. 5. Накопичення міцеліальної маси штамми *C. militaris* на середовищах з різними початковими значеннями рН (14-та доба): штам 1862; штам 2029.

Оптимальним для росту досліджених штамів є рН 6,0–6,5. За цих значень вихід біомаси становив понад 11,5 г/л на 14-ту добу культивування у стаціонарних умовах. За даними літератури, під час вирощування культури *C. militaris* діапазон оптимальних значень рН для росту міцелію і накопичення екзополісахаридів становив 5,0–6,0 [24–26]. За іншими даними, у разі дослідження фізіології *C. militaris* на рідких живильних середовищах максимальну концентрацію біомаси (8,1 г/л) було одержано за початкового значення рН 9,0 [3].

Виходячи з отриманих нами даних і аналізу літератури можна зробити висновок, що залежність росту культур *C. militaris* від рН середовища є штамоспецифічною ознакою і для кожного штаму на певному середовищі слід знаходити його оптимальне значення.

Для росту вегетативного міцелію *C. militaris* кращими джерелами вуглецю були глюкоза, лактоза і сахароза (табл. 3).

Максимальну кількість міцеліальної маси спостерігали для штаму *C. militaris* 1862 (понад 11,2 г/л), *C. militaris* 2029 (12,9 г/л) і екзополісахаридів (2,6 і 2,4 г/л) відповідно.

За даними літератури [24], штами *C. militaris* добре використовують глюкозу, крохмаль і сахарозу, на середовищах з такими

вуглеводами культури накопичують понад 8,5 г/л біомаси на 4-ту добу культивування.

Нами встановлено, що під час росту культур на середовищах із різними джерелами вуглецевого живлення рН змінювалось у кислий бік. Зниження рН середовища залежало в основному від природи джерела вуглецю і швидкості його використання. На живильних середовищах із повільним використанням джерела вуглецю, зокрема крохмалю, значення рН знижувалось у процесі росту меншою мірою (до 4,8–5,2), ніж на середовищах з глюкозою (4,0–4,2).

Як джерела азоту застосовували неорганічні ( $\text{NaNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) і органічні (пептон, дріжджовий і кукурудзяний екстракт). Серед органічних оптимальними джерелами азоту для росту *C. militaris* були пептон і дріжджовий екстракт (накопичення міцеліальної маси — понад 12 г/л) (табл. 4).

Оптимальним серед неорганічних джерел азоту виявився фосфат амонію (кількість біомаси — понад 10,0 г/л). Це можна пояснити тим, що фосфат амонію є джерелом не лише азоту, але й фосфору, який є необхідним для нормального росту грибів.

Слід зазначити, що оптимальні для накопичення біомаси *C. militaris* глюкоза, сахароза, пептон, дріжджовий екстракт є поширеними компонентами рідких і твердих живильних середовищ і їх найчастіше застосовують для культивування різних видів грибів, у тому числі й роду *Cordyceps* [11, 12, 24–26].

Визначення накопичення екзополісахаридів на рідких середовищах (табл. 4) показало, що їх максимальна кількість фіксується на середовищах із пептоном та дріжджовим екстрактом (2,9 і 2,1 г/л відповідно). Найменший вплив на цей показник мали середовища з мінеральними джерелами азоту.

За даними літератури, накопиченню екзополісахаридів сприяли фосфат амонію

Таблиця 3. Вплив джерел вуглецю на ріст *C. militaris* і синтез екзополісахаридів

Джерело вуглецю	<i>C. militaris</i> , 1862		<i>C. militaris</i> , 2029	
	Біомаса, г/л	Екзополісахариди, г/л	Біомаса, г/л	Екзополісахариди, г/л
Глюкоза	11,3±0,4	2,4±0,2	12,7±0,3	2,2±0,1
Крохмаль	10,8±0,3	1,8±0,1	11,5±0,2	1,3±0,3
Ксиліоза	9,2±0,3	2,2±0,3	9,8±0,3	1,9±0,2
Лактоза	11,2±0,5	2,4±0,3	12,1±0,3	2,2±0,2
Мальтоза	11,0±0,3	1,1±0,2	11,6±0,4	0,9±0,1
Маноза	8,5±0,4	1,7±0,2	9,3±0,2	1,3±0,2
Сахароза	11,5±0,3	2,6±0,1	12,9±0,4	2,1±0,2

Таблиця 4. Вплив джерел азоту на ріст *C. militaris* і синтез екзополісахаридів

Джерело азоту	<i>C. militaris</i> , 1862		<i>C. militaris</i> , 2029	
	Біомаса, г/л	Екзополісахариди, г/л	Біомаса, г/л	Екзополісахариди, г/л
NaNO <sub>3</sub>	6,7±0,4	1,2±0,1	7,7±0,3	1,2±0,2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10,0±0,2	1,0±0,1	9,4±0,3	1,0±0,2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6,0±0,2	0,3±0,2	5,3±0,2	0,3±0,1
Пептон	12,0±0,4	2,9±0,3	12,8±0,4	2,6±0,1
Дріжджовий екстракт	12,0±0,3	2,1±0,2	12,5±0,3	2,0±0,3
Кукурудзяний екстракт (КЕ)	8,0±0,2	1,4±0,1	7,7±0,2	1,4±0,2

і пептон, на цих середовищах кількість їх становила 1,05 і 1,19 г/л відповідно [12]. У роботі [24] наведено дані щодо впливу джерел вуглецю й азоту на накопичення міцеліальної маси та екзополісахаридів. Найсприятливішими джерелами вуглецю виявились кукурудзяний екстракт і соєвий пептон (1,97 та 1,06 г/л відповідно).

Отже, особливості накопичення біомаси та екзополісахаридів *C. militaris* залежать передусім від складу середовища і пов'язані з наявністю речовин-індукторів та хімічною природою сполук, що є джерелами вуглецю й азоту для гриба.

Оскільки комплексні середовища, з одного боку, є сприятливішими для росту й одержання БАР з грибів, ніж синтетичні, а з другого — відносно дешевими, за культивування *C. militaris* доцільно використовувати середовища з пептоном і дріжджовим екстрактом.

Дані літератури, а також результати нашої роботи свідчать, що фізіологічні властивості різних видів грибів суттєво різняться і тому не може існувати універсального живильного середовища, склад якого був би оптимальним і придатним для будь-якої культури. Одержані дані щодо росту і біосинтетичної активності досліджених штамів *C. militaris* дають змогу в подальшому прогнозувати оптимізацію рідких живильних середовищ для глибокого культивування з метою одержання міцеліальної маси та екзополісахаридів.

У літературі ми не знайшли даних стосовно впливу світла на розвиток вегетативного міцелію. Проте відомо, що світло також впливає на морфологію культур і позначається на характері подальшого плодоношення.

Дослідження впливу світла на швидкість радіального росту і морфологію колоній штамів *C. militaris* під час культивування на агаризованому середовищі показало, що опромінення синім світлом (довжина хвилі 450,0 нм) збільшувало швидкість радіального росту *C. militaris* на 10,0%, а опромінення червоним світлом (632,8 нм) — на 13,8%. На 4-ту добу після опромінювання *C. militaris* у морфології його колоній на СА з'являються відмінності: у дослідному варіанті на відміну від контрольного край колонії стає білим пухнастим, ближчий до центру злегка втиснений міцелій жовтіє (рис. 6).

Опромінення посівного міцелію в імпульсному режимі (450,0 нм) індукувало формування стром гриба *C. militaris* на рідкому живильному середовищі з пептоном (рис. 7, А, Б).

Опромінення блакитним світлом (450 нм) стимулювало синтез біомаси *C. militaris* (5–10%). Як блакитне, так і червоне (632,8 нм) світло не впливало на акумуляцію ендополісахаридів і дещо зменшувало продукцію екзополісахаридів (табл. 5).

Таблиця 5. Ріст *C. militaris* і синтез полісахаридів після опромінення

Довжина хвилі	Біомаса, а.с.в.	Ендополісахариди, %	Екзополісахариди, г/л
Без опромінення	5,33±0,09	13,2±0,33	5,5±0,11
450,0 нм	6,18±0,17	13,3±0,47	3,3±0,08
632,8 нм	5,67±0,26	13,5±0,51	3,8±0,10

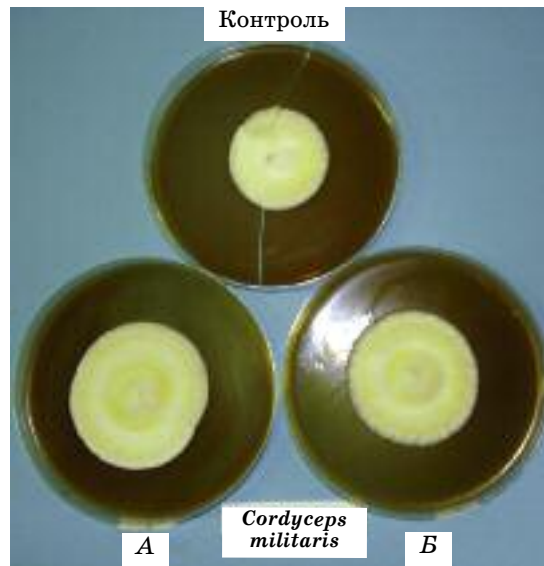


Рис. 6. Міцеліальні колонії *Cordyceps militaris* на СА після опромінення:  
 А — He-Ne лазером, довжина хвилі 632,8 нм; Б — аргонним лазером, довжина хвилі 450 нм

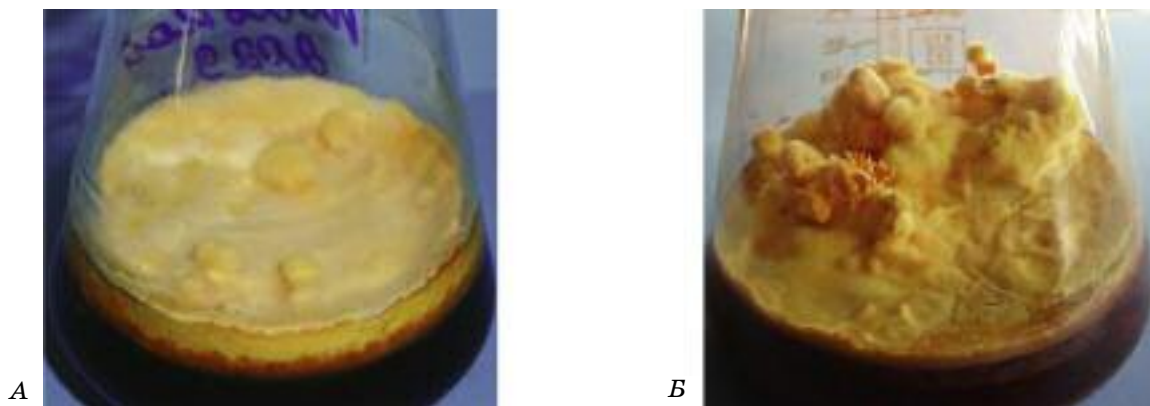


Рис. 7. Утворення стром *Cordyceps militaris* на рідкому середовищі з пептоном:  
 А — контроль; Б — після опромінення в імпульсному режимі (450,0 нм)

Таким чином, за допомогою сканувально-го електронного мікроскопа досліджено основні мікроморфологічні особливості вегетативного міцелію *C. militaris*. Виявлені мікроморфологічні ознаки можна використовувати для ідентифікації культур цього виду та контролю чистоти у вегетативній стадії росту за умов штучного культивування.

Отримано дані про ріст і морфологію культур *C. militaris* на агаризованих живильних середовищах різного складу за різних температур інкубації. За величиною швидкості росту досліджені штами можуть бути віднесені до групи грибів, що ростуть повільно. Проведені якісні ензиматичні

тести показали, що досліджені культури мають значний набір гідролітичних ензимів і за умов збереження в умовах колекції не втрачають своєї фізіологічної активності. Встановлено оптимальні для росту джерела вуглецю (глюкоза, лактоза і сахароза), органічні джерела азоту (пептон, дріжджовий екстракт) та фосфат амонію (рН 6,0–6,5).

Доведено, що опромінення світлом різної природи стимулює біологічну активність вегетативного міцелію, що сприяє збільшенню швидкості радіального росту та накопиченню біомаси на рідких середовищах.

## ЛІТЕРАТУРА

1. *Евлахова А. А.* Энтомопатогенные грибы. — Л.: Наука, 1974. — 260 с.
2. *Коваль Э. З.* Клавиципитальные грибы СССР. — К.: Наук. думка, 1984. — 287 с.
3. *Kim S. W., Xu C. P., Hwang H. J. et al.* Production and characterization of exopolysaccharides from an entomopathogenic fungus *Cordyceps militaris* NG3 // *Biotechnol. Progr.* — 2003. — V. 19. — P. 428–435.
4. *Yu K. W., Suh H. J., Bac S. H. et al.* Chemical properties and physiological activities of stromata of *Cordyceps militaris* // *J. Microbiol. Biotechnol.* — 2001. — V. 11. — P. 266–274.
5. *Ng T. B., Wang H. X.* Pharmacological actions of Cordyceps, a prized folk medicine // *J. Pharm. Pharmacol.* — 2005. — V. 57, N 12. — P. 1509–1519.
6. *Isaka M., Kittakoy P., Kirtikara K., Hywel-Jones N.* Bioactive substances from insect pathogenic fungi // *Acc. Chem. Res.* — 2005. — V. 38, N 10. — P. 813–823.
7. *Dai Yu-Ch., Yang Zh-L., Cui B-K., Yu Ch-J.* Species diversity and utilization of medicinal mushrooms and fungi in China (review) // *Int. J. Med. Mushrooms.* — 2009. — V. 11, N 3. — P. 287–302.
8. *Kim G. Y., Yun J. W.* Water extract of *Cordyceps militaris* enhances maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells *in vitro* // *Biol. Pharm. Bull.* — 2006. — V. 29, N 2. — P. 354–360.
9. *Leung P. H., Zhang Q. X., Wu J. Y.* Mycelium cultivation, chemical composition and anti-tumour activity of a *Tolyposcladium* sp. Fungus isolated from wild *Cordyceps sinensis* // *J. Appl. Microbiol.* — 2006. — V. 101. — P. 275–283.
10. *Xu C. P.* Application of statistically based experimental designs for the optimization of exo-polysaccharide production by *Cordyceps militaris* NG3 // *Biotechnol. Appl. Biochem.* — 2002. — V. 36, Pt. 2. — P. 127–131.
11. *Dong C. H., Yao Y. I.* Nutritional requirements of mycelial growth of *Cordyceps sinensis* in submerged culture / *J. Appl. Microbiol.* — 2005. — V. 99, N 3. — P. 483–492.
12. *Kim S. W., Hwang H. J., Xu C. P.* Optimization of submerged culture process for the production of mycelial biomass and exo-polysaccharides by *Cordyceps militaris* C738 // *Ibid.* — 2003. — V. 94. — P. 120–126.
13. *Бухало А. С., Митропольська Н. Ю., Михайлова О. Б.* Каталог культур Колекції культур шапинкових грибів (ІБК). — К.: Альтерпрес, 2011. — 100 с.
14. *Соломко Е. Ф., Ломберг М. Л., Митропольська Н. Ю.* Ріст окремих видів лікарських макроміцетів на живильних середовищах різного складу // *Укр. ботан. журн.* — 2000. — Т. 57, № 2. — С. 119–126.
15. *Бухало А. С.* Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. — К.: Наук. думка, 1988. — 144 с.
16. *Molitoris H. P.* Methods for determination of enzymatic activities of marine fungi // *Czech Mycol.* — 2000. — V. 52, N 2. — P. 97–24.
17. *Методы экспериментальной микологии: Справочник / Под ред. В. И. Билай.* — К.: Наук. думка, 1982. — 550 с.
18. *Варбанец Л. Д., Здоровенко Г. М., Книрель Ю. А.* Методы исследования эндотоксинов. — К.: Наук. думка, 2006. — 238 с.
19. *Kobayasi Y., Shimizu D.* The genus *Cordyceps* and its allies from New Guinea // *Bull. Nat. Sci. Mus., Ser. B (Bot.).* — 1976. — V. 2, N 4. — P. 133–151.
20. *Zare R., Gams W.* A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. // *Nova Hedwigia.* — 2001. — V. 73, N 1–2. — P. 1–50.
21. *Zare R., Gams W.* A revision of the *Verticillium* fungicola species complex and its affinity with the genus *Lecanicillium* // *Mycol. Res.* — 2008. — V. 112, N 7. — P. 811–824.
22. *Bridge P. D., Clark M. S., Pearce D. A.* A new species of *Paecilomyces* isolated from the Antarctic springtail *Cryptopygus antarcticus* // *Mycotaxon.* — 2005. V. 92. — P. 213–222.
23. *Крюков В. Ю., Ярославцева О. Н., Седнев Г. Р., Борисов Б. А.* Локальные эпизоотии, вызванные кордиципитоидными грибами (*Ascomycota, Hypocreales*), в популяциях лесных чешуекрылых и пилильщикова летне-осеннего комплекса в Сибири // *Микол. фитопатол.* — 2010. — Т. 44, Вып. 4. — С. 315–328.
24. *Park J. P., Kim S. W., Hwang H. J., Yum J. W.* Optimization of submerged culture conditions for the mycelial growth and exopolysaccharide production by *Cordyceps militaris* // *Lett. Appl. Microbiol.* — 2001. — V. 33. — P. 76–81.
25. *Билай В. И.* Основы общей микологии. — К.: Вища школа, 1989. — 392 с.
26. *Kim H. O., Yun J. W.* A comparative study on the production of exo-polysaccharides between two entomopathogenic fungi *Cordyceps militaris* and *C. sinensis* in submerged mycelial cultures // *Ibid.* — 2005. — V. 99, N 4. — P. 728–738.

**НЕКОТОРЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ  
СВОЙСТВА ГРИБА  
*Cordyceps militaris* (L.: Fr.) Fr. (*Ascomycota*)  
КАК ПРОДУЦЕНТА  
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ**

О. В. Михайлова  
Н. Л. Поединок

Институт ботаники им. Н. Г. Холодного  
НАН Украины,  
Киев

E-mail: mikhajlov\_e@ukr.net

Представлены результаты исследования роста и морфологических особенностей культур лекарственного гриба *Cordyceps militaris* из коллекции Института ботаники им. Н. Г. Холодного НАН Украины. Методом сканирующей электронной микроскопии изучены характерные для данного вида микроморфологические структуры. Морфолого-культуральные исследования проводили на четырех агаризованных питательных средах. Для всех исследованных штаммов оптимальными для вегетативного роста были глюкозо-пептон-дрожжевой агар и мальц-экстракт агар, температура инкубации — 16 °С, критическая температура — 36 °С. Оптимальными источниками углерода для вегетативного роста мицелия были глюкоза, лактоза и сахароза, среди органических источников азота — пептон и дрожжевой экстракт, рН 6,0–6,5. Облучение светом различной природы стимулировало скорость радиального роста гриба на агаризованных и накопление биомассы — на жидких питательных средах.

**Ключевые слова:** *Cordyceps militaris*, сканирующая электронная микроскопия, рост, морфология, температура инкубации, источники углерода и азота, рН, мицелиальная масса.

**SOME BIOLOGICAL PROPERTIES  
OF *Cordyceps militaris* (L.: Fr.) Fr.  
(*Ascomycota*) MUSHROOM  
AS PRODUCER OF MEDICINAL  
SUBSTANCES**

О. В. Mykchaylova  
N. L. Poyedinok

Kholodny Institute of Botany of National  
Academy of Sciences of Ukraine,  
Kyiv

E-mail: mikhajlov\_e@ukr.net

Results of the study on growth and morphological peculiarities of valuable medicinal mushroom *Cordyceps militaris* from the culture collection of mushrooms of Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine are given. Using the method of scanning electron microscopy, the micro-morphological structures specific to this species were studied. This allows identifying this species in pure culture. Culture-morphological studies were performed on four agar nutrient media. Glucose-peptone-yeast agar medium, malt agar extract and incubation temperature of 16 °C were the most favorable for the vegetative growth of all the tested strains. Temperature of 36 °C is critical. Maximal growth of *C. militaris* was observed at pH 6.0–6.5. The optimal sources of carbon for vegetative mycelium growth were glucose, lactose and sucrose, whereas peptone and yeast extract were the best sources of nitrogen. Light irradiation of different nature stimulated the radial growth in agar media and accumulation of their biomass in liquid ones.

**Key words:** *Cordyceps militaris*, scanning electron microscopy, the growth, morphology, incubation temperature, carbon and nitrogen sources, pH, mycelia mass.



# СТВОРЕННЯ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ЛІПОСОМНОЇ ФОРМИ АДЕНОЗИН-5-ТРИФОСФАТУ ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОГО ЗАСТОСУВАННЯ

О. В. Хробатенко<sup>1</sup>  
Н. В. Притутьська<sup>1</sup>  
С. М. Шульга<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Київський національний торговельно-економічний університет,  
Україна  
<sup>2</sup>ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки  
НАН України», Київ

E-mail: shulga5@i.ua

Отримано 27.02.2013

Досліджено використання ліпосомної форми аденозин-5-трифосфату для перорального введення. Наведено методи одержання і визначення розмірів ліпосом та відсоткового вмісту в них аденозин-5-трифосфату. Вивчено вплив ліпосомної форми аденозин-5-трифосфату на фізичну працездатність лабораторних тварин методом плавання до граничного виснаження. Показано, що застосування ліпосомної форми порівняно з вільним аденозин-5-трифосфатом (за аналогічного дозування) сприяло підвищенню працездатності лабораторних тварин. За одноразового введення ліпосомної форми аденозин-5-трифосфату протягом 6 днів у дозі 30 мг/кг підвищилась працездатність на 62%, а в дозі 60 мг/кг – на 76%, 12 днів – на 64% і 93%, відповідно.

**Ключові слова:** аденозин-5-трифосфат, ліпосоми, ліпосомна форма аденозин-5-трифосфату, фізична працездатність.

Аденозин-5-трифосфат (АТФ) — нуклеотид, який відіграє роль універсального джерела енергії для біохімічних процесів, що відбуваються в організмі людини [1]. За активації м'язової діяльності гідроліз АТФ пришвидшується й інтенсивність енергетичного обміну зростає в 100–1 000 разів порівняно зі станом спокою. Проте запасів АТФ вистачає лише на перші 2–3 с рухової активності, після чого організмові доводиться їх поновлювати [2].

Концентрація АТФ у м'язах відображає баланс між швидкістю ресинтезу АТФ та швидкістю його утилізації. Величина концентрації, навіть під час довільного скорочення м'язів, завжди є досить стабільною. З підвищенням активності скорочення м'язів підвищується ступінь утилізації АТФ, що пов'язано зі значним збільшенням активності ензимів, які беруть у цьому участь. Із фізіологічного погляду зниження швидкості використання АТФ призводить до розвитку втоми або неспроможності м'язів виконувати необхідну роботу. У цій ситуації втома виконує роль захисного бар'єра, який забезпечує підтримку достатнього рівня АТФ у тому разі, коли механізми його ресинтезу не дають змоги задоволь-

нити потребу в цій сполуці. Пригнічення АТФазної активності призводить до зниження швидкості утилізації АТФ, що перешкоджає надмірному зменшенню його рівня в м'язовому волокні [3].

Додаткове споживання АТФ дає змогу поповнювати енергетичні ресурси організму, сприяє адаптації до інтенсивних фізичних навантажень, підвищенню фізичної працездатності та прискоренню процесів відновлення. Однак через дуже короткий період напіврозпаду в крові виникає проблема складності доставлення АТФ до клітин. За екзогенного надходження АТФ швидко руйнується під дією позаклітинних ензимів до аденозиндифосфату (рис. 1), а потім до аденозинмонофосфату і аденозину [2].

Окрім того, АТФ, як й інші гідрофільні аніони, не може потрапити до клітини через плазматичну мембрану. Вищезазначені фактори унеможливають використання АТФ як біоенергетичного субстрату [4–7].

У пошуках альтернативного способу захисту від руйнування за перорального застосування АТФ було досліджено ліпосомні форми АТФ. Широкі можливості застосування ліпосом (замкнених везикул, оточених одним або декількома шарами ліпідів),



Рис. 1. Реакція розпаду АТФ

зумовлені сукупністю їхніх біологічних властивостей: хімічною інертністю, біосумісністю, відсутністю токсичності [8]. Ліпосоми здатні спрямовано доставляти біологічно активні речовини у потрібні органи і тканини організму.

Ліпосоми використовують у медицині і харчовій промисловості. Також як вектори їх застосовують у генній терапії.

Ефективність ліпосомної форми АТФ було продемонстровано в низці досліджень. Зокрема, в роботі [9] показано позитивний ефект застосування ліпосомної форми АТФ для захисту ендокринних клітин людини від нестачі енергетичних ресурсів у моделі клітинної культури сепсису. У роботі [10] встановлено, що використання ліпосомної форми АТФ дає змогу компенсувати більшу кількість ішемічних виявів, допустимих перед зниженням електричної активності мозку і остаточним руйнуванням його клітин. У роботах [5, 6] показано, що ліпосомна форма АТФ захищає клітини міокарда від ішемічних і реперфузійних ушкоджень. У вищезазначених роботах ліпосомні форми АТФ вводили парентерально.

Мета роботи полягала у виборі оптимального способу отримання ліпосомної форми АТФ для перорального застосування та дослідження ефективності споживання ліпосомної форми АТФ з метою підвищення фізичної працездатності.

## Матеріали і методи

**Виготовлення ліпосомної форми АТФ** здійснювали, використовуючи метод заморожування-відтавання, що є найбільш ефективним для включення АТФ у ліпосоми [4]. Для отримання ліпосом брали суміш соняшникового лецитину (ВАТ «НВЦ Дніпротехнології», Україна), холестеролу (AppliChem GmbH, Німеччина) і поліетиленгліколю (A.C.E.F. S.p.A., Італія) у масовому співвідношенні 2,45:1:0,04. Підготовлену суміш розчиняли в органічному розчиннику та випарювали в ротаційному випарювачі до утворення ліпідної плівки. Процес гідролізу ліпідної плівки проводили за температури 40 °С розчином АТФ (Sigma, США) за кон-

центрації 20 ммоль/л протягом 30 хв. Здійснювали 10 циклів заморожування-відтавання. Заморожування проводили за температури -80 °С, танення — на водяній бані за +30 °С [11]. Розчин АТФ, що не ввійшов у ліпосоми, відділяли центрифугуванням [4]. Одержаний розчин пропускали через екструдер із мембранами, діаметром пор 200 і 100 нм.

**Вміст включеного в ліпосоми АТФ** визначали за допомогою вискоефективної рідинної хроматографії (Dionex Ultimate 3000, колонка Discovery C18 250×4,6 мм, 5 мкм, Supelco (США), аналіз проводили в ізократичних умовах, рухома фаза — суміш 0,1 моль буфера  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  і метанолу у співвідношенні 96:4 v/v за швидкості потоку 1 мл/хв,  $\lambda = 254$  нм [4–7]).

**Розмір ліпосом обчислювали** за допомогою динамічного світлорозсіювання, використовуючи лазерний фотонкореляційний спектрометр Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, Великобританія) [12]. Спектрометр дає змогу встановити коефіцієнт дифузії дисперсних частинок у рідині, аналізуючи характерний час флуктуації інтенсивності розсіяного світла. Реєстрацію та статистичну обробку лазерного випромінювання, розсіяного від водної суспензії ліпосомної форми АТФ, здійснювали за температури 25 °С під кутом розсіювання 173°. Для контролю стабільності вимірювання повторювали 4 рази. Результати розподілу за розмірами в одиницях інтенсивності та кількісному вимірі одержали з аналізу кореляційної функції з використанням алгоритму General purpose програмного забезпечення Zetasizer Software 6.20.

**Для визначення біодоступності ліпосомної форми АТФ** було використано 50 білих лінійних мишей-самців з масою тіла 22–28 г. Дослідні тварини перебували у віварії за температури повітря 20–24 °С, вологості — не більше 65%, у режимі «день-ніч». Тварини знаходились у металевих клітках достатнього розміру, на стандартному раціоні віварію і отримували питну воду та корм *ad libitum* [13]. Експерименти на тваринах виконували відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схвалених I–IV Національними конгресами з біоетики (Київ, 2001–2011 рр.) і узгоджених з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей», Страсбург, 1985 [14]. Протокол дослідів було погоджено Комісією

з біоетики ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України».

Методом випадкової вибірки тварини було розподілено на 5 груп по 10 особин:

- перша — інтактна група тварин, яких утримували за стандартних умов віварію (контроль);
- друга — група тварин, яким перорально вводили АТФ з розрахунку 30 мг/кг;
- третя — група тварин, яким перорально вводили АТФ з розрахунку 60 мг/кг;
- четверта — група тварин, яким перорально вводили ліпосомну форму АТФ з розрахунку 30 мг/кг;
- п'ята — група тварин, яким перорально вводили ліпосомну форму АТФ з розрахунку 60 мг/кг.

Результати досліджень зі встановлення активності АТФ [15, 16] було враховано під час вибору доз. Ліпосомну форму АТФ і АТФ у вільному вигляді вводили за 5 хв до початку експерименту.

Вплив ліпосомної форми АТФ на фізичну працездатність лабораторних тварин вивчали за методом плавання до граничного виснаження [17].

Експериментальних тварин поміщали в резервуар діаметром 1,5 м, завглибшки 0,8 м, заповнений водою з температурою 28–32 °С. З води попередньо видаляли бульбашки повітря шляхом кип'ятіння. Вантаж, що становив 7,5% від маси тіла тварини, прикріплювали до основи її хвоста таким чином, щоб тварина могла вільно рухатись. Критерієм стомлювання і припинення плавання вважали перше «пірнання» із зануренням носових пазух у воду. Ефективність дії ліпосомної форми АТФ оцінювали за збільшенням тривалості плавання дослідних груп порівняно з контрольними групами, які отримували АТФ у вільному вигляді [17]. Експеримент проводили на 6-ту та 12-ту

добу за щоденного споживання мишами ліпосомної форми АТФ. В інші дні миші виконували тренувальне плавання в резервуарі без вантажу протягом 15 хв.

**Статистичну обробку результатів** проводили шляхом розрахунку середніх арифметичних величин, їх середньоквадратичних відхилень і похибок. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували критерій Стьюдента. Розбіжності вважали статистично вірогідними за  $P \leq 0,05$  [18].

### Результати та обговорення

Ефективність включення АТФ у ліпосоми визначали методом вискоефективної рідинної хроматографії.

Після статистичної обробки отриманих даних кількість АТФ, включеного в ліпосоми, з вірогідністю  $P = 0,95$  становила  $41,7 \pm 0,9\%$ . Одержані результати свідчать про відносно високий рівень включення АТФ, що співвідноситься з даними літератури [4].

Вимірювання кореляційної функції флуктуацій інтенсивності розсіяного світла й інтегральної інтенсивності розсіювання дає змогу визначити коефіцієнт трансляційної дифузії дисперсних частинок в розчинах і за рівнянням Стокса встановити розподіл наночастинок за розміром. Вимірювання повторювали 4 рази з усередненням результату (рис. 2, а). Діапазон дисперсності ліпосом в одиницях інтегральної інтенсивності розсіювання виявився досить широким (рис. 2, б). За результатами проведених досліджень було встановлено, що ліпосомна форма АТФ є стабільною.

Розміри сумарної фракції ліпосом знаходились у межах від 30 до 1 000 нм, хоча розміри переважної більшості ліпосом ( $W$  за кількістю = 91%) — в діапазоні від 30 до

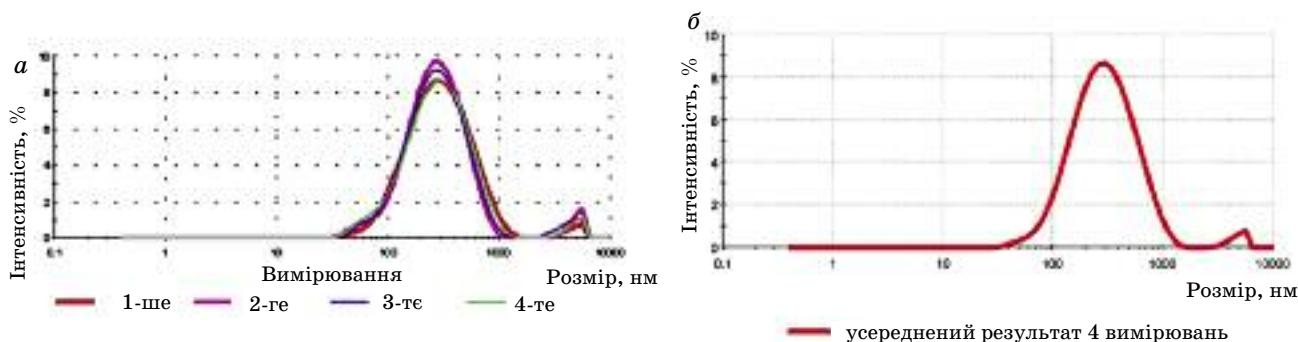


Рис. 2. Розподіл сумарної фракції ліпосомної форми АТФ за розмірами (в одиницях інтенсивності)

100 нм (рис. 3, а, б) і лише незначна кількість фосфоліпідних структур ( $W$  за кількістю = 9%) мали розміри, що перевищують 100 нм.

Між рисунками 2 і 3 існує принципова різниця. Перший дає уявлення про інтегральний (сумарний) розподіл всіх частинок (везикул) у розчині. Другий показує конкретне розподілення частинок з вірогідністю  $P \leq 95\%$  за розмірами (30–100 нм).

Проте розміри останніх настільки великі, що їхня інтегральна інтенсивність розсіювання ( $W$  за інтенсивністю = 93%) значно перевищує цей показник для всіх ліпосом, менших за 100 нм ( $W$  за інтенсивністю = 7%).

Одержані дані можуть свідчити про наявність у досліджуваному зразку мультіламелярних ліпосом (складаються з багатьох ліпідних шарів, розділених водними фазами, і мають великі розміри) [8].

Результати дослідження функціональної ефективності ліпосомної форми АТФ наведено в таблиці.

Проведені дослідження згідно з методом плавання до граничного виснаження показали, що інтактна група тварин на 6-й день експерименту утримувалась на воді протягом  $138,4 \pm 5,5$  с, що співвідноситься з даними літератури [17].

Як впливає з даних таблиці, тривалість утримання на воді 2-ї та 3-ї груп дослідних тварин як на 6-й, так і на 12-й день експерименту достовірно не відрізнялись ( $P \leq 0,05$ )

від інтактної групи (контроль) в аналогічний період дослідження. Це підтверджує той факт, що у вільному вигляді АТФ не може слугувати біоенергетичним субстратом [4–7].

Для 4-ї та 5-ї груп тривалість утримання тварин на воді на 6-й день експерименту становила  $234,8 \pm 5,1$  с ( $P \leq 0,05$ ) і  $237,6 \pm 4,7$  с ( $P \leq 0,05$ ), що на 70% і 91% вище, відповідно, ніж результати інтактної групи. На 12-й день експерименту тривалість утримання тварин на воді 4-ї та 5-ї груп на 71% ( $P \leq 0,05$ ) і 106% ( $P \leq 0,05$ ), відповідно, перевищувала результати інтактної групи (контролю).

Таким чином, введення ліпосомної форми АТФ сприяло підвищенню фізичної працездатності лабораторних тварин за одноразового споживання протягом 6 днів у дозі 30 мг/кг на 62% ( $P \leq 0,05$ ), у дозі 60 мг/кг — на 76% ( $P \leq 0,05$ ), а протягом 12 днів — на 64% ( $P \leq 0,05$ ) і 93% ( $P \leq 0,05$ ), відповідно, порівняно із застосуванням АТФ у вільному вигляді за аналогічного дозування.

Одержані дані свідчать про властивість ліпосомної форми АТФ затримувати настання втоми. Введення АТФ у вільному вигляді суттєвим чином не вплинуло на фізичну витривалість лабораторних тварин, що може свідчити про швидку деградацію цієї речовини в організмі.

Слід зауважити, що енергетичний стан м'язової тканини є далеко не єдиним чинником,

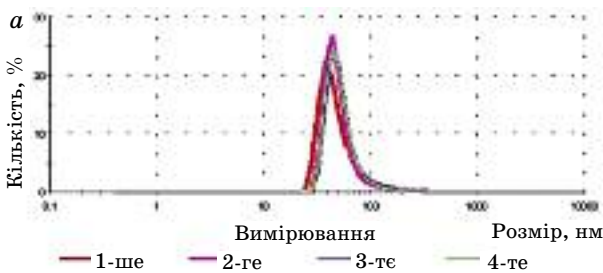


Рис. 3. Кількісний розподіл ліпосомної форми АТФ за розмірами

#### Дослідження ефективності ліпосомної форми АТФ

День експерименту	1-ша група	2-га група	3-тя група	4-та група	5-та група
	Тривалість плавання, с				
6-й	$138,4 \pm 5,5$	$144,5 \pm 2,7$	$149,9 \pm 4,6$	$234,8 \pm 5,1^*$	$264,3 \pm 7,1^*$
12-й	$138,9 \pm 6,5$	$145,2 \pm 3,9$	$148,3 \pm 5,1$	$237,6 \pm 4,7^*$	$286,3 \pm 9,4^*$

Примітка: \*  $P \leq 0,05$  порівняно з контролем (перша група).



на який впливає АТФ для запобігання розвиткові втоми [3]. У роботі [15] було зроблено припущення про вплив АТФ на пуриноенергетичні рецептори з наступним метаболічним ефектом. Екзогенні макроергічні нуклеотиди не можуть слугувати субстратом енергетичних шляхів як через незначну їх кількість, так і через швидку метаболічну деградацію. Результати досліджень [15] дають підстави вважати, що такий ефект може бути основним у механізмі актопротекторного впливу нуклеотидів. Відомо, що пуринові нуклеотиди беруть участь у регуляції активності аденілатциклазної системи. Варто зазначити, що ефекти, які спричинюють пуринові нуклеотиди, мають різноспрямований характер, який залежить від специфічності тканини. Крім того, екзогенний АТФ виявляє виражені ангіодилатуючі властивості і, таким чином, може змінювати співвідношення притоку і відтоку метаболітів у функціонально активних органах у бік їх оптимізації.

Таким чином, у результаті проведених досліджень було використано оптимальний спосіб одержання ліпосомної форми АТФ для перорального застосування, що забезпечив відносно високий рівень включення АТФ у ці частинки. Встановлено, що ліпосомна форма АТФ є стабільною і в разі використання екструдерів з мембранами відповідних розмірів (200 нм і 100 нм) можна отримати ліпосоми, розміри яких лежать у діапазоні 30–100 нм. Метод плавання до граничного виснаження показав, що використання ліпосомної форми АТФ сприяло збільшенню фізичної витривалості лабораторних тварин порівняно з інтактною групою та групами, яким уводили вільний АТФ.

Одержані дані можуть свідчити про затримку настання втоми пуриновими нуклеотидами. Це підтверджує той факт, що ліпосомна форма АТФ може слугувати біоенергетичним субстратом і застосовуватись для створення харчових продуктів для дієтичного споживання.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Gordon J. L. Extracellular ATP: effects, sources and fate // *Biochem. J.* — 1986. — P. 309–319.
2. Спрайет Л. Анаэробный метаболизм при высокоинтенсивных физических нагрузках // *Метаболизм в процессе физической деятельности* / Под ред. М. Харгривса. — К.: Олимп. лит. — 1998. — С. 9–51.
3. Грин Г. Метаболические факторы утомления // *Метаболизм в процессе физической деятельности* / Под ред. М. Харгривса. — К.: Олимп. лит. — 1998. — С. 233–286.
4. Liang W., Levchenko T. S., Torchilin V. P. Encapsulation of ATP into liposomes by different methods: optimization of the procedure // *J. Microencapsul.* — 2004. — P. 251–261.
5. Hartner W. C., Verma D. D., Levchenko T. S. et al. ATP-loaded liposomes for treatment of myocardial ischemia. *WIREs. Nanobiotechnol.* — 2009. — P. 530–539.
6. Verma D. D., Levchenko T. S., Bernstein E. A., Torchilin V. P. ATP-loaded Liposomes Effectively Protect Mechanical Functions of the Myocardium from Global Ischemia in an Isolated Rat Heart Model // *J. Control. Release.* — 2005. — P. 460–471.
7. Arakawa A., Ishiguro S., Ohki K., Tamai M. Preparation of liposome-encapsulation of adenosine triphosphate // *Tohoku J. Exp. Med.* — 1998. — P. 39–47.
8. Морозова Ю. А. Липосомальная система доставки антигена вируса ССЯ-76 для пероральной иммунизации птиц: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.23. СПб. гос. технолог. ин-т. — СПб., 2003. — 20 с.
9. Han Y. Y., Huang L., Jackson E. K. et al. Liposomal ATP or NAD<sup>+</sup> protects human endothelial cells from energy failure in a cell culture model of sepsis // *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* — 2001. — P. 107–116.
10. Laham A., Claperon N., Durussel J. J. et al. Intracarotid administration of liposomally-entrapped ATP: improved efficiency against experimental brain ischemia // *Pharmacol. Res. Commun.* — 1988. — P. 699–705.
11. Пат. 77865 UA, A23J 7/00, A61K 9/127, A61K 31/7076. Спосіб отримання ліпосомної форми аденозин-5-трифосфату (АТФ) для перорального застосування / Притульська Н. В., Хробатенко О. В., Шульга С. М. — Заявл. 20.09.2012; Опубл. 25.02.13; Бюл. № 4. — 4 с.
12. *The use of zeta potential measurements to study sterically stabilized liposomes* [Electronic resource] — [www.malvern.co.uk](http://www.malvern.co.uk).



13. *Науково-практичні* рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними. — К.: Авіцена, 2002 р. — 156 с.
14. *European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.* — Council of Europe, Strasbourg, 1986. — 53 p.
15. Мороз В. М., Липницький Т. Н., Кутняк В. П. и др. Изучение и сравнительная оценка актопротекторной активности АТФ-ЛОНГ в эксперименте // Лік. справа. — 2002. — № 7. — С. 99–101.
16. Вдовенко Н. В. Вплив аденозинтрифосфат-вмісних сполук на прооксидантно-антиоксидантну рівновагу за умов інтенсивного фізичного навантаження: Автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.04. Нац. аграр. ун-т. — К., 2005. — 20 с.
17. Бобков Ю. Г., Виноградов В. Н. Фармакологическая коррекция утомления. — М.: Медицина, 1984. — 206 с.
18. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. — Л.: Медицина, 1973. — 144 с.

**СОЗДАНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ  
ЛИПОСОМНОЙ ФОРМЫ  
АДЕНОЗИН-5-ТРИФОСФАТА  
ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ**

*А. В. Хробатенко<sup>1</sup>  
Н. В. Притульская<sup>1</sup>  
С. М. Шульга<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Киевский национальный  
торгово-экономический университет,  
Украина

<sup>2</sup>ГО «Институт пищевой биотехнологии  
и геномики НАН Украины», Киев

*E-mail:shulga5@i.ua*

**CREATING AND INVESTIGATION  
OF ADENOSINE-5-TRIPHOSPHATE  
LIPOSOMAL FORMS  
FOR ORAL APPLYING**

*O. V. Khrobotenko<sup>1</sup>  
N. V. Prytul'ska<sup>1</sup>  
S. M. Shulga<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Kyiv National University of Trade  
and Economics, Ukraine

<sup>2</sup>State Organization «Institute of Food  
Biotechnology and Genomics» of National  
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

*E-mail:shulga5@i.ua*

Исследовано использование липосомной формы аденозин-5-трифосфата для перорального введения. Приведены методы получения и определения размеров липосом, а также процентного содержания в них аденозин-5-трифосфата. Изучено влияние липосомной формы аденозин-5-трифосфата на физическую работоспособность лабораторных животных методом плавания до предельного истощения. Показано, что использование липосомной формы по сравнению со свободным аденозин-5-трифосфатом (в аналогичной дозировке) способствовало увеличению работоспособности лабораторных животных. Применение липосомной формы при однократном введении в течение 6 дней в дозе 30 мг/кг способствовало увеличению работоспособности на 62%, в дозе 60 мг/кг — на 76%, 12 дней — на 64% и 93% соответственно.

**Ключевые слова:** аденозин-5-трифосфат, липосомы, липосомная форма аденозин-5-трифосфата, физическая работоспособность.

Liposomal form of adenosine-5-triphosphate (ATP) for oral applying was studied. The methods of obtaining and determining the size of the liposomes, the definition of ATP percentage content in liposomes were proposed. The effect of liposomal form of ATP on physical performance of laboratory animals by swimming to the limit of exhaustion was studied. It was shown that using of the liposomal form as compared with free ATP (in a similar dose) promoted the increased efficiency of laboratory animals. Application of liposomal form occurring at single administration for 6 days at a dose of 30 mg/kg facilitated a 62% increase of efficiency, and 60 mg/kg did 76%, while consumption of liposomal form of ATP for 12 days did 64% and 93%, respectively.

**Key words:** liposomes, liposomal form ATP, physical performance.

# ЗАЛЕЖНІСТЬ АКТИВНОСТІ ЦЕЛЮЛОЗОЛІТИЧНИХ ЕНЗИМІВ МОНО- ТА ДИКАРІОТИЧНИХ КУЛЬТУР *Stereum hirsutum* (Wild.) Gray (*Basidiomycetes*) ВІД СУБСТРАТУ

С. М. Бойко  
М. Є. Рязанова

Донецький національний університет, Україна

E-mail: bsm73@ukr.net

Отримано 30.05.2012

Досліджено активність целюлозолітичних ензимів культур *Stereum hirsutum* (Wild.) Gray, різних за ядерним статусом, залежно від субстрату. Найпродуктивнішими за синтезом ендоглюконаз були монокаріотичні культури Sh1-4 та Sh7-2. Встановлено, що живильне середовище зі вмістом фільтрувального паперу є оптимальним для синтезу целюлаз (культура Sh1-4, максимум целюлозолітичної активності — 319  $\mu\text{M}/\text{mg}$ , культура Sh7-2 — 101  $\mu\text{M}/\text{mg}$ ). За культивування на тирсі деревини максимум целюлозолітичної активності у культури Sh1-4 спостерігали на 10-ту добу — 142  $\mu\text{M}/\text{mg}$  (тирса дуба), у культури Sh7-2 — на 20-ту добу — 34  $\mu\text{M}/\text{mg}$  (тирса ясеня). Дослідження якісного складу целюлозолітичних ензимів дало змогу встановити наявність чотирьох екзоензимів  $C_x$ -комплексу з відносною електрофоретичною рухливістю 0,22; 0,24; 0,47; 0,74. Ензим з відносною електрофоретичною рухливістю 0,47 відзначається високою концентрацією та активністю.

**Ключові слова:** целюлозолітичні ензими, *Stereum hirsutum*, монокаріотичні культури, електрофорез протеїнів.

Сучасним напрямом прикладних мікологічних досліджень є пошук перспективних продуцентів біологічно активних речовин. Науковий досвід свідчить, що дереворуйнівні базидіальні гриби мають лабільну й різноманітну ензиматичну систему, складність якої зумовлена структурою природних субстратів, якими вони живляться. Саме тому в біотехнологічній галузі базидіоміцети розглядають як перспективні продуценти сировини для виробництва харчових добавок, антибіотиків, стероїдів, різних кислот, ріст-активуючих речовин, вітамінів тощо [1]. Ензиматична конверсія рослинної сировини, продукти трансформації якої можна широко застосовувати для одержання продуктів харчування, протеїново-вітамінних концентратів, спиртів, а також як заміники вуглеводного палива, є актуальним питанням сьогодення [2].

До найбільш вивчених целюлаз нижчих грибів належать ензиматичні системи представників родів *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* [3], серед вищих грибів можна відзначити представників родів *Phanerochaete*, *Coriolus*, *Schizophyllum*,

*Irpex*, *Stereum* [1, 4]. Сапротрофні дереворуйнівні гриби мають у своєму складі весь спектр ензимів (екзо-, ендоглюканази, целобіогідролази, целобіази, геміцелюлази, пектинметилгідролази, екзо-, ендополігалактуронази), що потрібні для біодеградації складних і водночас широко розповсюджених компонентів. Активність окремих компонентів целюлазного комплексу досить видоспецифічна й істотно залежить від умов культивування [1, 5]. Тому пошук та добір високоактивних культур є першочерговим завданням у вирішенні питання біотрансформації лігноцелюлозної сировини [6]. Базидіальний гриб *Stereum hirsutum* (Wild.) Gray є космополітом, трапляється на залишках багатьох видів листяних дерев [7]. Про зацікавленість науковців цим грибом та його властивостями свідчать публікації [8–11]. Трофічна невибагливість *S. hirsutum* може вказувати на високий потенціал ензимів гідролітичного комплексу. Враховуючи значну гетерогенність спорового матеріалу, високоактивна дикаріотична культура може становити інтерес для біотехнології.

Мета роботи — дослідити залежність целюлозолітичної активності моно- та дикаріотичних культур сапротрофного гриба *S. hirsutum* за культивування на різних субстратах.

### Матеріали і методи

Попередньому скринінгу було піддано шість дикаріотичних культур *S. hirsutum*. Далі відібрали дві найактивніші культури, які було виділено з плодкових тіл грибів, що зростали у м. Ялті (Південний Берег Криму) — Sh1 та м. Макіївці (Південний Схід України) — Sh7. Виділення чистої культури проводили за загальновідомими методами з використанням перексиду водню [12]. Одержану чисту культуру вирощували на картопляно-агаризованому середовищі у термостаті ТС-80М-2 за температури 26 °С. Моноспорові культури (Sh1-1, Sh1-2, Sh1-3, Sh1-4, Sh7-1, Sh7-2, Sh7-5) отримували методом спорових відбитків, з яких робили змив з наступним багаторазовим розведенням стерильною дистильованою водою. Однорідну водну суспензію базидіоспор висівали глибинно у чашки Петрі на агаризоване середовище й пророщували у термостаті [12]. Чистоту та належність до моноспорових культур контролювали за допомогою мікроскопії.

Штами культивували на рідкому живильному середовищі Чапека такого складу (г/л):  $\text{NaNO}_3$  — 2 г,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  — 1 г,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,5 г,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,01 г,  $\text{KCl}$  — 0,5 г [13]. Як єдине джерело вуглецю використовували фільтрувальний папір (Whatman № 1, щільність 80 г/м<sup>2</sup>). Природним джерелом вуглецю слугувала дрібна тирса деревини абрикоса (*Prunus* sp.), ясеня (*Fraxinus* sp.) та дуба (*Quercus* sp.) у кількості 50 мг на 20 мл живильного середовища. Культивування проводили у колбах Ерленмеєра об'ємом 100 мл за оптимальної температури 24 °С упродовж 20 діб.

Активність позаклітинних ендоглюканаз визначали на 5-, 10-, 15- та 20-ту добу культивування стосовно Na-карбоксиметилцелюлози (C5678, Sigma). За одиницю активності приймали кількість редуруючих цукрів ( $\mu\text{M}$ ), утворених 1 мг протеїну, що міститься в культуральній рідині, за 1 год. Редууючі цукри виявляли методом Шомоді-Нельсона [12, 14]. Кількість протеїну визначали спектрофотометрично [15, 16].

Якісний склад  $\text{C}_x$ -ендоглюканаз оцінювали електрофоретичним методом. Для цього застосовували 7,5%-й поліакриламідний

гель зі вмістом Na-КМЦ з використанням трис-гліцинової буферної системи (рН 8,3) [17, 18]. Гель витримували протягом 30 хв у 0,2 М фосфатному буфері за температури 50 °С. Потім забарвлювали його, використовуючи барвник конго-червоний. Концентрування культуральної рідини здійснювали за допомогою системи Vivaspin turbo 15 (Sartorius stedim biotech GmbH).

Отримані дані обробляли статистично за допомогою дисперсійного аналізу, зокрема порівняння середніх — за методом Дункана [19].

### Результати та обговорення

Попередній скринінг культур *S. hirsutum* дав змогу встановити найбільш активні ізоляти з подальшим синтезом ензимів целюлозолітичної дії (рис. 1). Так, культура Sh1-4 показала вірогідний максимум активності на 5-ту добу — 319  $\mu\text{M}$ /мг протеїну. Культура Sh7-2 була менш активною (101  $\mu\text{M}$ /мг), але вірогідний максимум її целюлозолітичної активності також спостерігався на 5-ту добу. Високі показники питомої целюлозолітичної активності на 5-ту добу пояснюються низькою концентрацією загального протеїну в культуральній рідині, що свідчить про високу синтетичну активність у культури саме целюлаз. Однак низька концентрація протеїну унеможлиблює його практичне отримання в цей термін. Слід також зазначити, що хоча дикаріотичні культури Sh1 та Sh7 *S. hirsutum* містять удвічі більше ДНК, вони не мають суттєвої переваги в експресії целюлозолітичних ензимів. Завдяки гетерогенності монокаріотичних культур деякі з них виявляють ендоглюканазну активність, що є значно вищою порівняно з батьківськими культурами.

На другому етапі дослідження використовували культури, найбільш активні за синтезом ензимів целюлозолітичної дії. Встановлено, що загалом питома целюлозолітична активність досліджуваних культур на фільтрувальному папері була вищою, ніж у разі культивування на тирсі дерев різних видів (рис. 2). Вірогідний максимум целюлозолітичної активності у культури Sh1-4 за культивування на тирсі деревини спостерігали на 10-ту добу — 142  $\mu\text{M}$ /мг протеїну (тирса дуба).

У випадку з культурою Sh7-2 найкращою деревиною був ясень, показник дорівнював 34  $\mu\text{M}$ /мг на 20-ту добу культивування (рис. 3). Максимум целюлозолітичної

активності за культивування на деревині абрикоса зафіксовано на 10-ту добу культивування — 21  $\mu\text{M}/\text{мг}$ , а у разі культивування на деревині дуба — 26  $\mu\text{M}/\text{мг}$  на 20-ту добу.

Для електрофоретичного дослідження застосовували культуральні фільтрати ізо-

лятів Sh1-4 та Sh7-2 *S. hirsutum*, що їх було попередньо сконцентровано. Культури вирощували за оптимальних умов на живильному середовищі Чапека, яке містило фільтрувальний папір. Якісний склад целюлаз  $\text{C}_x$ -комплексу наведено на рис. 4.

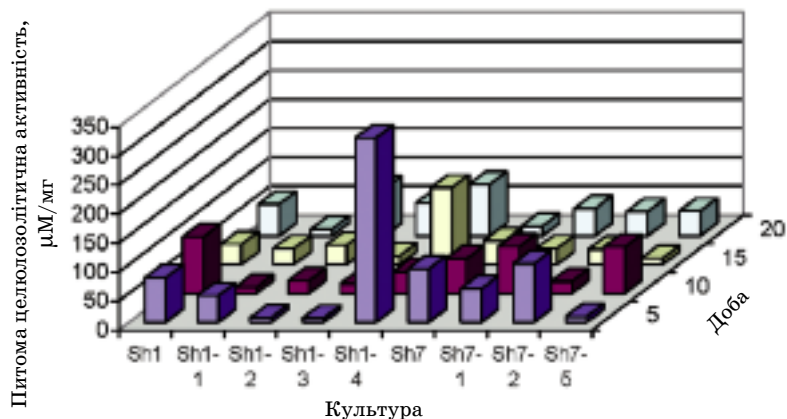


Рис. 1. Порівняльна характеристика питомої целюлолітичної активності дикаріотичних та моноспорових культур *S. hirsutum*

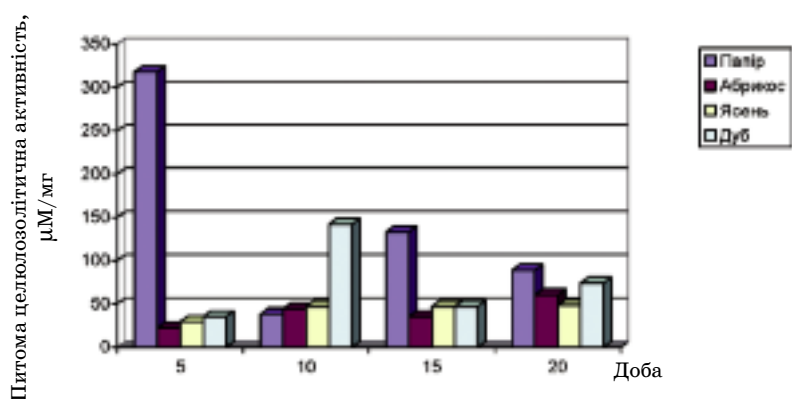


Рис. 2. Порівняння питомої целюлолітичної активності моноспорової культури Sh1-4 *Stereum hirsutum* за культивування на різних субстратах

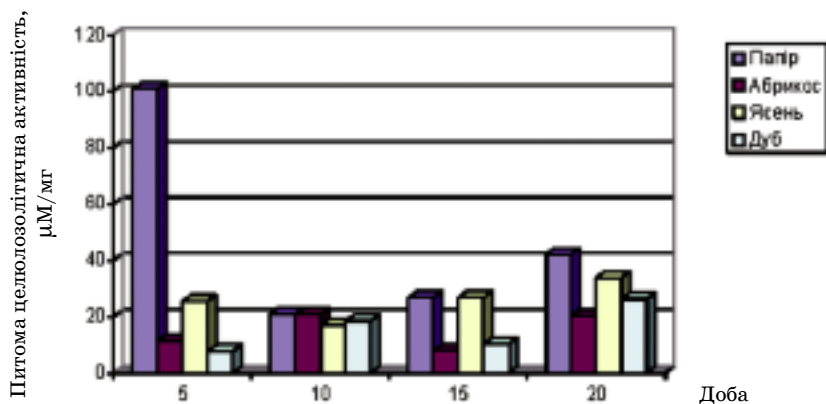


Рис. 3. Порівняння питомої целюлолітичної активності моноспорової культури Sh7-2 *Stereum hirsutum* за культивування на різних субстратах

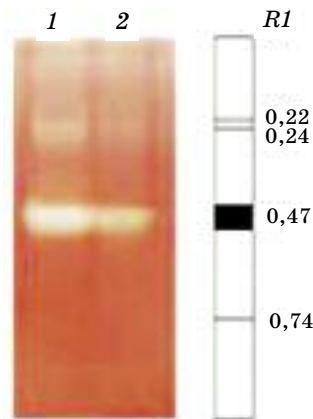


Рис. 4. Електрофореграма  $C_x$ -целюлаз монокаріотичних культур *S. hirsutum*:  
1 — ізолят Sh1-4; 2 — ізолят Sh7-2.

Загалом було виявлено чотири екзоензими  $C_x$ -комплексу культур *S. hirsutum*. Ізоензим з відносною електрофоретичною рухливістю 0,47 добре визначається навіть за умов використання неконцентрованого культурального фільтрату. Концентрування останнього приблизно у 12 разів допомогло визначити ще три ізоензими, однак їхня активність є дуже низькою. За своєю електрофоретичною рухливістю ензими двох культур схожі.

Таким чином, проведені дослідження дали змогу встановити суттєву гетероген-

ність за целюлозолітичною активністю дита монокаріотичних культур *S. hirsutum*. Визначено монокаріотичні культури Sh1-4 та Sh7-2 як найбільш активні продуценти екзоензимів целюлозолітичної дії. Усі досліджені культури *Stereum hirsutum* мають вищі показники целюлозолітичної активності за культивування на середовищі, що містить фільтрувальний папір. За допомогою зимограми встановлено, що в культур *S. hirsutum* відбувається експресія чотирьох екзоензимів  $C_x$ -комплексу.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Даниляк Н. И., Семичаевский В. Д., Дудченко Л. Г. и др. Ферментные системы высших базидиомицетов. — К.: Наук. думка, 1989. — 280 с.
2. Синицын А. П., Гусаков А. В., Черноглазов В. М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов: Уч. пособие. — М.: Изд-во МГУ, 1995. — 224 с.
3. Wood T. M. Fungal cellulases // Biochem. Soc. Trans. — 1992b. — V. 20. — P. 46–53.
4. Novotny C., Cajthaml T., Svobodova K. et al. *Irpex lacteus*, a white-rot fungus with biotechnological potential // Folia Microbiol. — 2009. — V. 54, N 5. — P. 375–390.
5. Билай В. И., Билай Т. И., Мусич Е. Г. Трансформация целлюлозы грибами. — К.: Наук. думка, 1982. — 296 с.
6. Древаль К. Г., Бойко М. І. Нові продуценти целюлозолітичних ензимів серед вищих базидіальних грибів // Біотехнологія. — 2011. — Т. 4, № 1. — С. 87–92.
7. Лессо Т. Грибы: Определитель. — М.: ООО «Издательство АСТ», 2003. — 304 с.
8. Palma C., Contreras E., Urra J., Martinez M. Eco-friendly technologies based on banana peel use for the decolorization of the dyeing process wastewater // Waste Biomass Valor. — 2011. — V. 2. — P. 77–86.
9. Heilmann-Clausen J., Boddy L. Inhibition and stimulation effects in communities of wood decay fungi: exudates from colonized wood influence growth by other species // Microb. Ecol. — 2005. — V. 49. — P. 399–406.
10. Nguyen Ngoc-Phuong-Thao, Lee Kyung-Mi, Lee Kyung-Min et al. One-step purification and characterization of a  $\beta$ -1,4-glucosidase from a newly isolated strain of *Stereum hirsutum* // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2010. — V. 87. — P. 2107–2116.
11. Бойко С. М. Різноманітність внутрішньоклітинних ферментних систем природних штамів *Stereum hirsutum* (Willd.) Gray (*Basidiomycetes*) на території Донецької області // Укр. бот. журн. — 2012. — Т. 69, № 2. — С. 286–291.



12. *Билай В. И.* Методы экспериментальной микологии. — К.: Наук. думка, — 1982. — 50 с.
13. *Семенов С. М.* Лабораторные среды для актиномицетов и грибов: Справочник. — М.: Агропромиздат, 1999. — 240 с.
14. *Green F., Clausen C. A., Highley T. L.* Adaptation of the Nelson-Somogyi reducing-rugar assay to a microassay using microtiter plates // *Anal. Biochem.* — 1989. — V. 182. — P. 197–199.
15. *Кочетов Г. А.* Практическое руководство по энзимологии. — М.: Высш. шк., 1980. — 272 с.
16. *Дарбре А.* Практическая химия белка: Пер. с англ. — М.: Мир, 1989. — 623 с.
17. *Остерман Л. А.* Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). — М.: Наука, 1981. — 288 с.
18. *Bartley T. D., Murphy-Holland K., Eveleigh D. E.* A method for the detection and differentiation of cellulase components in polyacrylamide gels // *Anal. Biochem.* — 1984. — V. 14. — P. 157–161.
19. *Приседський Ю. Г.* Статистична обробка результатів біологічних експериментів. Навч. посібн. — Донецьк: Кассиопея, 1999. — 210 с.

**ЗАВИСИМОСТЬ АКТИВНОСТИ  
ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКИХ ЭНЗИМОВ  
МОНО- И ДИКАРИОТИЧЕСКИХ КУЛЬТУР  
*Stereum hirsutum* (Wild.) Gray  
(*Basidiomycetes*)  
ОТ СУБСТРАТА**

*С. М. Бойко  
М. Е. Рязанова*

Донецкий национальный университет,  
Украина

*E-mail: bsm73@ukr.net*

Исследована активность целлюлозолитических энзимов культур *Stereum hirsutum* (Wild.) Gray, различных по ядерному статусу, в зависимости от субстрата. Наиболее продуктивными относительно синтеза эндоглюканаз были монокариотические культуры Sh1-4 и Sh7-2. Установлено, что питательная среда, содержащая фильтровальную бумагу, является оптимальной для синтеза целлюлаз (культура Sh1-4, максимум целлюлозолитической активности — 319  $\mu\text{M}/\text{mg}$ , культура Sh7-2 — 101  $\mu\text{M}/\text{mg}$ ). Максимум целлюлозолитической активности при культивировании с опилками древесины у культуры Sh1-4 наблюдался на 10-е сут — 142  $\mu\text{M}/\text{mg}$  (опилки дуба), у культуры Sh7-2 — на 20-е сут — 34  $\mu\text{M}/\text{mg}$  (опилки ясеня). Исследование качественного состава целлюлозолитических энзимов позволило установить наличие четырех экзоэнзимов  $C_x$ -комплекса с относительной электрофоретической подвижностью 0,22; 0,24; 0,47; 0,74. Энзим с относительной электрофоретической подвижностью 0,47 отличается высокой концентрацией и активностью.

**Ключевые слова:** целлюлозолитические энзимы, *Stereum hirsutum*, монокариотические культуры, электрофорез протеинов.

**ACTIVITY DEPENDENCE  
OF CELLULOLYTIC ENZYMES MONO-  
AND DIKARYOTIC CULTURES  
OF *Stereum hirsutum* (Wild.) Gray  
(*Basidiomycetes*)  
FROM A SUBSTRATUM**

*S. M. Boiko  
M. E. Ryzanova*

Donetsk national university,  
Ukraine

*E-mail: bsm73@ukr.net*

Activity of cellulolytic enzymes cultures *Stereum hirsutum* (Wild.) Gray, different nuclear status, depending on the substrate have been studied. The most productive by synthesis endoglucanases monokaryotic cultures of Sh1-4 and Sh7-2 were determined. It is found that nutrient medium containing filtering paper is optimal for synthesis of cellulase (culture Sh1-4, maximum of cellulolytic activity is 319  $\mu\text{M}/\text{mg}$ , culture Sh7-2 — 101  $\mu\text{M}/\text{mg}$ ). Maximum of cellulolytic activity at cultivation with sawdust of trees for culture Sh1-4 observed at the 10<sup>th</sup> day was 142  $\mu\text{M}/\text{mg}$  (oak sawdust), for culture Sh7-2 at the 20<sup>th</sup> days it was 34  $\mu\text{M}/\text{mg}$  (ash-tree sawdust). Study of quality cellulolytic enzymes enabled to establish presence of four exoenzymes of  $C_x$  complex with a relative electrophoretic mobility of 0.22; 0.24; 0.47; 0.74. Enzyme with relative electrophoretic mobility 0.47 showed high concentration and activity.

**Key words:** cellulolytic enzymes, *Stereum hirsutum*, monokaryotic cultures, electrophoresis of proteins.

УДК 579.864.1:615.331

## ОБЗОР МЕЖДУНАРОДНЫХ ПРОЕКТОВ В ОБЛАСТИ МИКРОБНОЙ ЭКОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА И СОЗДАНИЯ ПРОБИОТИКОВ

С. А. СТАРОВОЙТОВА

Национальный университет пищевых технологий, Киев, Украина

E-mail: svetik\_2004@mail.ru

Получено 13.03.2012

В работе охарактеризованы современные крупномасштабные и всемирно известные проекты, касающиеся изучения микробной экологии человека и создания пробиотиков, а именно: «Общество микробной экологии и заболеваний», «Пробиотики и здоровье. Целевая инициатива», проекты «Микробиом человека», MetaHIT, «Метаболом человека» и некоторые другие. Дана краткая историческая справка, а также ссылка на официальные сайты по каждому из предлагаемых научных проектов. Описаны основные цели и задачи каждого из них. Приведены краткая характеристика проектов и доступные на сегодняшний день результаты исследований по каждому из рассмотренных научных направлений. Акцентировано внимание на важности этих проектов для расширения научных знаний в области микробной экологии человека, а также с целью усовершенствования и/или создания новых эффективных пробиотиков на основе представителей нормальной микрофлоры кишечника человека. Показана тесная взаимосвязь научных данных, полученных в ходе реализации проектов.

**Ключевые слова:** пробиотики, международные проекты в области микробной экологии человека.

Согласно современным представлениям пробиотики — это живые микроорганизмы и/или вещества микробного либо иного происхождения, оказывающие при естественном способе введения благоприятное влияние на физиологические, биохимические и поведенческие реакции организма хозяина через оптимизацию его микрофлоры [1]. Следовательно, пробиотики предназначены для поддержания и восстановления этой микрофлоры. В свою очередь, микробная экология человека — это наука, изучающая состав и функции природной микрофлоры различных биотопов человека, взаимоотношения эндогенной микрофлоры с макроорганизмом (организм человека или животного) и окружающей средой, а также взаимосвязь между отдельными компонентами микробных ценозов в норме и при патологии [2].

В настоящее время совершенствование уже существующих и создание новых пробиотиков является одной из главных задач в области биотехнологии в Украине и большинстве стран мира, о чем свидетельствует количество и многообразие международных

проектов в этой области. Ниже представлены лишь наиболее известные и значимые проекты, занимающиеся проблематикой в данной отрасли науки.



**Society for Microbial Ecology and Disease.** Одним из важнейших проектов в области микробной экологии человека и создания пробиотиков является Общество микробной экологии и заболеваний (Society for Microbial Ecology and Disease — SOMED).

Еще в середине 70-х годов прошлого века группа американских и европейских ученых, активно занимающихся изучением кишечной микрофлоры человека, основали Общество кишечной микробной экологии и заболеваний (Society for Intestinal Microbial Ecology and Disease — SIMED), первое собрание которого состоялась в 1976 г. в США.

Основными целями SIMED были:

- обмен информацией;
- организация ежегодных международных встреч, проходящих либо в США, либо в Европе;

– распространение информации о результатах научных исследований кишечной микрофлоры человека в норме и при патологии.

Вначале организация встреч была основным заданием нового Общества, но с течением времени спектр задач расширялся, включая основание в 1988 году официального журнала «Microbial Ecology in Health and Disease» («Микробная экология в норме и при патологии»), который способствовал публикации научных результатов, полученных членами SIMED.

Во время деловой встречи SIMED, проходящей одновременно с XIII Международным симпозиумом по кишечной микробной экологии (International Symposium on Intestinal Microecology, 11–14 сентября 1988 г., Порто Конте, Италия), поступило предложение пересмотреть название Общества в связи с необходимостью согласовать области микробной экологии и кишечной экологии. В результате членами Общества было принято решение сменить название Общества кишечной микробной экологии и заболеваний (SIMED) на Общество микробной экологии и заболеваний (SOMED), поэтому официально датой основания Общества является сентябрь 1988 г. За многолетнюю историю существования президентами Общества были: David Hentges (март 1987 — март 1989); Tracy D. Wilkins (март 1989 — март 1991); Andrew B. Onderdonk (март 1991 — март 1993); Giovanni Panichi (март 1993 — март 1995); Sherwood Gorbach (март 1995 — март 1997); Peter S. Borriello (март 1997 — март 1999); Rial D. Rolfe (март 1999 — март 2001); Tore Midtvedt (март 2001 — март 2004); Bodil L. Jacobsen (март 2004 — март 2006); Gianfranco Donelli (март 2006 — март 2008); Gianfranco Donelli (март 2008 — март 2010).

Сегодня Президентом SOMED является С. Камия (S. Kamiya) — профессор департамента инфекционных заболеваний Киоринского медицинского университета, председатель японской ассоциации гнотобиологии.

#### Основные цели SOMED:

– содействие развитию научных знаний, поддержка исследований и технологий в области микробной экологии и связанных с ней заболеваний;

– объединение усилий ученых, занимающихся научными исследованиями на местах, и распространение научной информации, касающейся этой области исследований;

– сотрудничество с национальными и международными организациями, исследу-

емыми проблемы микробной экологии и заболевания, связанные с ее нарушениями;

– организация и спонсирование научных встреч и конференций для ускорения достижения вышеупомянутых целей.

Общество имеет свой устав, в котором определены:

– название и цели Общества;

– членство (Общество должно состоять из активных, вспомогательных, корпоративных и заслуженных членов в отставке);

– главенство (глава Общества — президент, избираются также вице-президент, секретарь, казначей);

– комитеты (в структуре Общества дей-

ствуют несколько комитетов: избирательный, программный, издательский и комитет по связям);

– порядок проведения встреч и голосований.

С другой информацией по структуре и работе Общества можно детально ознакомиться на официальном сайте Общества — [www.somed.nu](http://www.somed.nu) [3, 4].



International Science and Technology Center. Международный научно-технический центр — межправительственная организация, налаживающая деловые связи между учеными из России, Украины, Грузии и других стран Содружества Независимых Государств (СНГ) с коллегами из исследовательских организаций в Канаде, ЕС, Японии, Республике Корея, Норвегии и США.

МНТЦ призвано способствовать реализации международных научных проектов, а также оказывать помощь глобальному научному и деловому сообществу в поиске и привлечении к сотрудничеству институтов стран СНГ, которые обладают уникальными научными ноу-хау, для совместных разработок и ведения бизнеса. Основная информация о деятельности Центра представлена на официальном сайте — [www.istc.ru](http://www.istc.ru).

МНТЦ определяет пробиотики как приоритетное направление исследований. За последние 10 лет количество исследований в области создания и совершенствования пробиотиков во всем мире увеличивалось в геометрической прогрессии: пищевая промышленность и фармацевтические компании инвестировали миллиарды долларов в научно-исследовательские и опытно-конструкторские разработки. Учитывая важность вопроса и необходимость дальнейших исследований, Совет МНТЦ согласовал и утвердил создание «Целевой инициативы»,

направленной на организацию и объединение усилий различных институтов стран СНГ и Грузии с целью удовлетворения потребностей организаций частного сектора и здравоохранения.

На заседании рабочей группы 34-го Международного конгресса SOMED (20–23 ноября 2011 года, Йокогама, Япония) были рассмотрены вопросы будущего финансирования Международным научно-техническим центром новых перспективных проектов «Пробиотики и здоровье. Целевая инициатива» **Probiotics & Health Targeted Initiative (TI PROBIO ISTC)**.

С тех пор профинансированы уже два проекта — в Институте иммунологической инженерии (Любуцаны, Россия) (проект стоимостью 330 000 дол. США по стимулированию иммунной системы пробиотиками) и в Институте эпидемиологии и микробиологии (Владивосток, Россия). Ученые, участвующие в проектах, тесно сотрудничают между собой, проводя совместные исследования. Управляющий комитет TI PROBIO ISTC начал активное обсуждение публикаций по исследованию пробиотиков через электронную почту.

Лидирующими научными институтами стран СНГ предложены восемь проектов (по микробному многообразию, астропробиотикам, ферментированному свекольному соку, бактериоцинам и т. д.), находящихся ныне в стадии рассмотрения Центра. Из поданных проектов планируется отобрать 2–3 предложения для создания проектов, финансируемых TI PROBIO ISTC, с продуктивным международным сотрудничеством для удовлетворения коммерческих потребностей мирового рынка.

Подготовлены и проведены три ISTC TI PROBIO семинара: 1) Объединенная конференция ISTC — Японская Ассоциация молочной кислоты; 2) Секреты кавказского

долгожительства (обе конференции прошли в июле 2010 г. в Японии с участием ведущих мировых исследователей в данной области); 3) TI PROBIO семинар, объединенный с первой встречей Управляющего комитета (4–6 октября 2010 г. в Армении), который посетили 30 исследователей из лидирующих научных институтов стран СНГ и 8 международных экспертов. Презентация деятельности TI PROBIO представлена на Японо-Русском семинаре 2010 г. и на 54-м ISTC Японском семинаре «Current Life-Threatening Infections and Medical Countermeasures» (май–июнь 2010 г., Токио и Ниигата, Япония), которые посетили 40 русских экспертов и лекторов, в основном из Сибири и Дальнего Востока. В ходе работы семинаров была достигнута договоренность о сотрудничестве между Университетом Ниигата и Красноярской медицинской школой в области создания нового пробиотика для лечения носительства *Staphylococcus aureus*.

С целью расширения сотрудничества и определения новых промышленных партнеров в Германии TI PROBIO была представлена на Немецко-Русском биотехнологическом форуме 16–18 мая 2010 г. в Мюнхене (Германия). Форум посетили 50 российских и немецких экспертов-биотехнологов, а также группа предпринимателей в области биотехнологии из Баварии.

14 июля 2010 г. была утверждена временная декларация финансовой поддержки целевых инициатив ISTC на 2010–2012 гг. Общий предполагаемый фонд финансирования составил 7 722 200.00 дол. США по всем четырем целевым инициативам (Drug Design & Development Targeted Initiative — **3D-TI**, Science & Technology in the Prevention of Biological Threats Targeted Initiative — **STPBT-TI**, Law Enforcement Targeted Initiative — **LETI**, Probiotics & Health Targeted Initiative — **TI PROBIO**) (табл. 1) [4, 5].

**Временная декларация финансовой поддержки целевой инициативы TI PROBIO ISTC на 2010–2012 гг.**

Команда/Партнер	Заинтересованность в сотрудничестве	Номинальный фонд, дол. США		
Канадская команда	Да	30 000.00	200 000.00	230 000.00
Команда ЕС	Нет			–
Японская команда	Да	60 000.00	500 000.00	560 000.00
Команда США	Нет			–
US DOE (GIPP)*	Да	100 000.00	1 000 000.00	1 100 000.00
Предварительная сумма		1 890 000.00		

Примечание: \* — Global Initiatives for Proliferation Prevention (GIPP) at the U.S. Department of Energy (DOE).



В начале третьего тысячелетия стартовала программа Human Microbiome Project (USA, 2006 г.) и MetaHIT Project (European Commission, 2008 г.). Главные цели этих проектов:

- детализация взаимоотношений клеток человека с его симбиотической микрофлорой;
- выявление, какие именно гены собственных клеток человека имеют общее и различное происхождение с генами его микробиома;
- распознавание, какие изменения в микробиоме человека коррелируют с изменениями в его здоровье;
- разработка новых технологических и биоинформационных методов и приемов, позволяющих достичь вышеуказанных целей;
- исследование этических, социальных, биотехнологических и других аспектов и последствий, возникающих в результате глубокого изучения микробиома человека [6, 7].



**Human Microbiome Project.** Проект инициирован Национальным институтом здоровья (National Institutes of Health).

Акцентируется изучение микробиологии пяти биотопов человека: ротовой полости, носовой полости, кожи, желудочно-кишечного тракта, урогенитального тракта (рис. 1). По предварительным оценкам ученых из США, численность клеток микроорганизмов может превышать количество собственных клеток человека на 1–3 порядка. Для того чтобы исследовать наиболее важные виды бактерий, обитающих в организме человека, расшифровать их геном, а также выяснить роль этих бактерий в условиях здорового организма и в условиях патологии, стартовала программа «Микробиом человека» (Human Microbiome Project — HMP).



Рис. 1. Биотопы человека, микрофлору которых планируется изучить в ходе проекта «Микробиом человека»

Все результаты по изучению микрофлоры различных биотопов организма человека, полученные в ходе проведения проекта «Микробиом человека», представлены в виде соответствующих карт или, как их еще называют, древ (рис. 2–5) [6–9].



Рис. 2. Обобщенное древо распределения микроорганизмов в различных биотопах организма человека

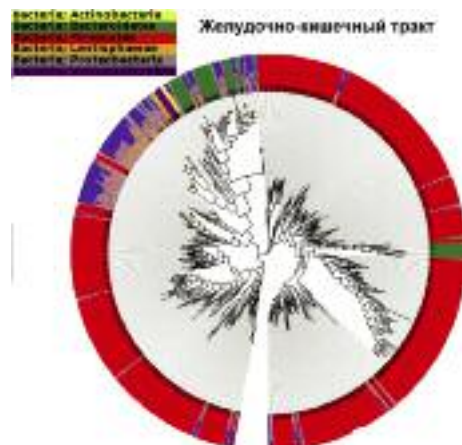


Рис. 3. Микробиом желудочно-кишечного тракта человека

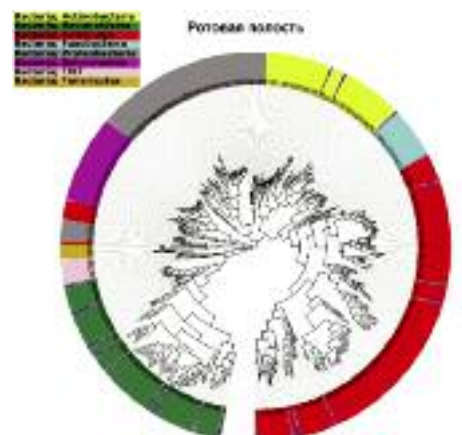


Рис. 4. Карта распределения микроорганизмов в ротовой полости человека



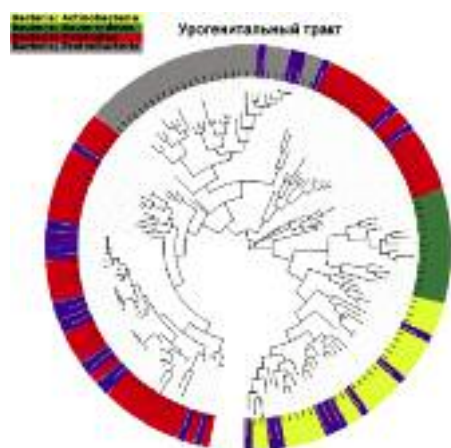


Рис. 5. Микробиом женского урогенитального тракта

Традиционно микробиологи фокусируют внимание на изучении индивидуальных изолированных видов микроорганизмов. Однако многие (если не большинство) виды микроорганизмов еще не могут быть успешно изолированы вследствие зависимости их роста от микроокружения, которое в силу ряда причин не может в настоящее время быть реализовано в лабораторных условиях. Благодаря преимуществам технологий ДНК-секвенирования создана новая область исследований — **метагеномика**, позволяющая всесторонне изучить микробные сообщества, включая даже содержащиеся некультивируемые микроорганизмы. Вместо изучения генома индивидуального бактериального штамма, выращенного в лабораторных условиях, возможности метагеномики позволяют анализировать генетический материал целого микробного сообщества, полученный из природной окружающей среды. В проекте «Микробиом человека» этот метод дополнит генетические анализы уже известных изолированных штаммов и обеспечит возможность получения неизвестной информации о сложности состава микробных сообществ человека.

Используя метагеномику и традиционные возможности генетического ДНК-секвенирования, проект «Микробиом человека» заложит фундамент для последующих работ по изучению микробных сообществ, ассоциированных с организмом человека [10–13].

Однако преимущества методов и технологий, впервые использованных в проекте «Микробиом человека», не ограничатся лишь изучением здоровья человека, а будут использованы в работах по изучению роли микроорганизмов в широком многообразии биологических процессов. Изучение натив-

ных представителей микробных сообществ является фундаментальным заданием микробиологии, наиболее трудноосуществимым на сегодняшний день.

Таким образом, проект «Микробиом человека» — это лишь одна из международных инициатив по использованию преимуществ метагеномного анализа при изучении здоровья человека. Он должен стать продолжением основанной проектом «Геном человека» практики международного сотрудничества для создания исчерпывающей и массово доступной базы данных. Полученная информация будет доступна широким массам исследователей, работающих в сфере изучения и улучшения здоровья человека. Более детальная информация по проекту представлена на официальных сайтах: <http://www.hmpdacc.org/>, <http://nihroadmap.nih.gov/hmp>.

Микробиологи считают, что большинство обитающих в теле человека микроорганизмов безвредны — это так называемая нормальная микрофлора. А некоторые из них являются необходимыми для здоровой жизни, в частности индигенная (синонимы — облигатная, главная, резидентная, автохтонная, доминантная) микрофлора [2]. Но еще одна сравнительно небольшая часть бактерий вызывает различные заболевания — от подростковых прыщей до язвы желудка. Причем, в отличие от возбудителей чумы или сибирской язвы, эти бактерии находятся в здоровом организме, приводя к развитию болезни только при неблагоприятном стечении обстоятельств.

Для выявления и изучения этих обстоятельств и предотвращения развития заболеваний, вызываемых постоянно живущими при человеке микробами, ученые из Американского института здоровья (NIH) в рамках проведения данной программы планируют расшифровать геном 400 генов бактерий из приблизительно 2 тыс. видов, составляющих микробиоту человека. Для реализации этого проекта до 2011 г. было выделено 115 млн. дол. США. По словам Бретта Финлея, микробиолога из Университета Британской Колумбии в Ванкувере, человека можно назвать «суперорганизмом», собственных клеток в котором не более 10%. Все остальное (90%) — это бактерии, заселяющие различные биотопы человека. Однако 90% — лишь по количеству, а не по массе (в силу их незначительных размеров). По весу вся микрофлора организма человека составляет приблизительно 2–3 кг в зависимости от массы тела взрослого человека [1].

Стерильный кишечник новорожденного заселяется множеством различных бактерий во время прохождения по родовым путям матери, заселенным физиологической микрофлорой, что приводит к наследственной передаче штаммового состава микрофлоры. Таким образом, в кишечнике новорожденного начинает образовываться настоящая экосистема. Между численностью разных микроорганизмов поддерживается определенное равновесие, причем для каждого человека — свое. Кишечная микрофлора играет важную роль в пищеварительной, иммуномодулирующей, детоксикационной и многих других функциях организма хозяина, а ранее считавшийся бесполезным аппендикс, как показало недавнее исследование, еще и выполняет роль убежища для бактерий.

Другое исследование, результаты которого активно используются в проекте «Микробиом человека», было посвящено коже. Биологи и медики из Национального института здоровья в США в процессе изучения микрофлоры кожи установили, что на ней обитает большая часть известных типов бактерий и даже составили карту, показывающую их распределение (рис. 6.). Сейчас эту карту будут использовать для отбора наиболее важных видов микроорганизмов, которые в наибольшей степени могут влиять на состояние здоровья человека [6–8].

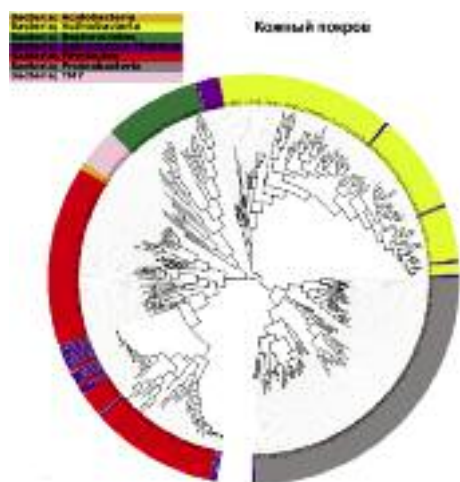


Рис. 6. Карта распределения известных видов бактерий, найденных на коже человека

Таким образом, можно сделать следующий вывод по функционированию данного проекта, обобщив все пункты его официальной программы.

Программные инициативы:

1. Совершенствование соответствующего набора последовательностей микробного

генома и предварительная характеристика микробиома человека.

Эта инициатива предполагает секвенирование более 600 геномов культивируемых и некультивируемых бактерий, а также некоторых микробов небактериального происхождения. Общая коллекция по уже полученным и еще находящимся в процессе разработки результатам должна достигнуть 1000 расшифрованных геномов.

В совокупности с метагеномными анализами это даст возможность охарактеризовать сложность микробных сообществ в различных биотопах организма человека, а также определить ядро микробиома каждого из биотопов. Исследования проводятся с использованием соответствующих современных методик, включая 16S rRNA секвенирование. В рамках проекта планируется изучить микробиом следующих биотопов человека: желудочно-кишечный и женский уrogenитальный тракты, ротовую и носовую полости, а также кожный покров [9].

2. Взаимосвязь между заболеваниями и изменениями в микробиоме человека.

Вторая инициатива включает ряд проектов, демонстрирующих взаимосвязь между здоровьем человека и изменениями в его микробиоме. Исследования проводятся с использованием баз данных, полученных в ходе реализации проекта «Микробиом человека».

3. Разработка новых технологий.

Данные по секвенированию, полученные при изучении микробиома человека будут положены в основу геномных микробных технологий, которые дадут возможность генерировать целые геномные последовательности, а также изолировать для изучения некультивируемые на сегодняшний день микроорганизмы, что в свою очередь позволит осуществить анализ всех членов сложных микробных популяций.

4. Разработка новых инструментов вычислительных анализов.

Базы данных, полученные метагеномным секвенированием и родственными методами, будут очень большими и сложными, что потребует новых аналитических инструментов для получения статистически достоверных данных.

5. Учреждение центра по координации и анализу данных (Data Analysis and Coordinating Center — DACC).

DACC рассматривается как ресурс, где можно будет найти информацию по проекту, его результаты и выводы. Основные специфические функции центра:

– отслеживать, хранить и распространять данные, полученные в ходе реализации проекта;

- координировать анализ данных;
- разрабатывать методы исправления данных для научного сообщества;
- координировать разработку стандартов метабазы;
- создавать портал для отображения деятельности международных проектов.

6. Создание ресурсного репозитория (ресурсной базы).

Центральная ресурсная база необходима для хранения материалов и реагентов, полученных в ходе выполнения НМР включая:

- культивируемые микроорганизмы;
- амплифицированные ДНК из некультивируемых микроорганизмов;
- метагеномные образцы ДНК.

Репозиторий — это доступный широким массам источник научного общества, а также информация для спонсоров и всех лиц, заинтересованных в ходе продвижения проекта.

7. Этические, правовые и социальные аспекты НМР-исследований.

Изучение этических, правовых и социальных аспектов в ходе проекта включает:

- аспекты здравоохранения и клиники (например, использование пробиотиков);
- потенциальное судебное использование микробиомных профилей;
- применение в биотерроризме и биозащите;
- использование новых технологий НМР;
- право собственности на свой собственный микробиом и конфиденциальность распространения информации [9].



**MetaHIT Project** (Metagenomics of the Human Intestinal Tract). Проект MetaHIT (Метагеномика кишечного тракта человека), финансируемый Европейской комиссией (European Commission), стартовал 1 января 2008 г. Группа, работающая над данным проектом, состоит из 13 научных и промышленных партнеров из 8 стран мира, в том числе пищевых и фармацевтических компаний. Общая стоимость проекта была оценена в более чем 21,2 млн. евро. Европейская комиссия уже выделила на исследования 11,4 млн. евро. Срок выполнения проекта — 1 января 2008 — 30 июня 2012 гг. Официальный сайт — <http://www.metahit.eu/>.

Главной целью проекта является изучение генома всех бактерий, составляющих кишечную микрофлору человека, а также

характеристика их функций в норме и при патологии [14].

Эволюция в технологии секвенирования и биоинформатике дает возможность массово картировать ДНК метагенома.

Партнеры Проекта MetaHIT смогут использовать ресурсы и разработки своих коллег и совместно создавать специфические компьютерные методы. Надежные партнеры из частных клиник будут поставлять биологический материал от пациентов, страдающих заболеваниями, в которых ключевую роль играет кишечная микрофлора (ожирение, хронические воспалительные заболевания кишечника). Сравнивая бактериальные композиции их кишечной микрофлоры с микрофлорой здоровых людей, исследователи смогут охарактеризовать профиль данного заболевания на метагеномном уровне, открывающем путь к разработке методов диагностики (рис. 7).

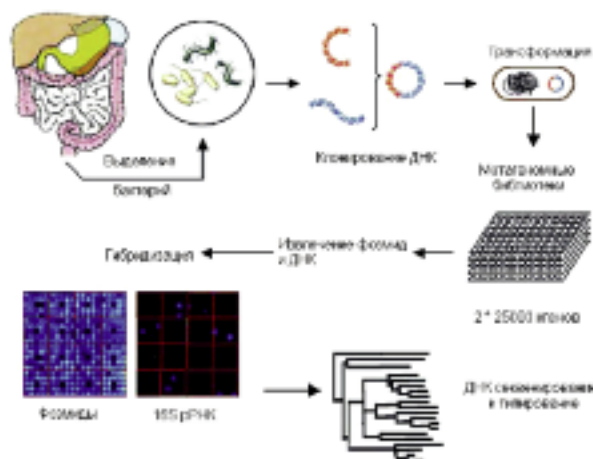


Рис. 7. Создание и скрининг метагеномных библиотек

Бактериальные клетки выделяются из фекалий шести здоровых людей и шести пациентов с заболеванием Крона в стадии ремиссии. Из них изолируются высокомолекулярные фрагменты ДНК (38–48 kpb). Далее метагеномная ДНК клонируется в фозмиды. Скрининг генов 16S рРНК в библиотеках фозмид проводится гибридизацией ДНК на нейлоновой мембране. Все последовательности определяются использованием четырех праймеров (ACM 008 F, ADM 330 F, SSM 1100 R и TTM 1517 R), специфичных к бактериям. Созданные последовательности, покрывающие в среднем 200–1 300 позиций, отбираются для проведения филогенетических анализов [12].

В ходе выполнения проекта будет проанализирована нуклеотидная последовательность геномов 100 бактериальных штаммов — наиболее частых представителей кишечной микрофлоры человека.



Первые 30 секвенированных штаммов — культивируемые бактерии, остальные 70 — некультивируемые бактерии. Для анализа некультивируемых бактерий индивидуальные бактериальные клетки будут изолировать и амплифицировать геном образовавшегося клона для получения достаточного количества ДНК для дальнейшего нуклеотидного секвенирования [10].

Информация по секвенированию интерпретируется в гены, протеины и функции, которые они определяют. Уже идентифицировано 19 000 различных функций в геномном каталоге. Статистический анализ показывает, что охвачены все функции, существующие в 124 образцах и, таким образом, имеется исчерпывающая картина генетического потенциала бактерий желудочно-кишечного тракта человека. Большая часть функций (свыше 500) ранее не была обнаружена, что свидетельствует о новизне полученных данных.

Идентифицированы также 6 000 функций, присутствующих у каждого индивидуума. Предполагают, что они составляют «минимальный метагеном», необходимый для реализации желудочно-кишечной микробиотой человека надлежащих функций. Среди них функции, которые отсутствуют в геноме человека, в частности возможность деградировать пищевые волокна и таким образом высвободить из них больше энергии или синтезировать витамины и незаменимые для организма человека аминокислоты. К сожалению, данных о функциях минимального метагенома на сегодняшний день крайне мало [13].

Кроме минимального метагенома, определен набор из 1 200 функций, присущих каждой бактерии, попавшей в кишечник человека. Выдвинуто предположение, что они представляют «минимальный кишечный геном». Половина из этих функций жизненно необходимы для бактерий. Однако большинство выявленных бактериальных функций специфичны для кишечных бактерий. Изучение их будет способствовать лучшему пониманию функций микрофлоры человека в норме и при патологии [15–24].



**Human Metabolome Project.** Проект «Метаболом человека» (Human Metabolome Project) стартовал в Канаде в 2005 г. Общая стоимость проекта — 7,5 млн. дол. США. Целью проекта является содействие исследованиям в области изучения метаболома для дальней-

шего облегчения диагностики заболеваний, прогноза и мониторинга метаболизма лекарственных препаратов, а также их токсикологии; обеспечение взаимосвязи между метаболом человека и его геномом; разработка программного обеспечения для метабономики [25].

Задачи проекта: идентификация, определение количества, каталогизирование и хранение всех метаболитов, найденных в тканях и биологических жидкостях человека в концентрации выше 1 мкм. Полученные в ходе проведения проекта данные свободны для доступа в электронном формате для всех исследователей через базу данных «Метаболом человека» — Human Metabolome Database ([www.hmdb.ca](http://www.hmdb.ca)) (рис. 8), а также через библиотеку «Метаболом человека» — Human Metabolome Library ([www.metabolibrary.ca](http://www.metabolibrary.ca)).

Черновой вариант метаболома — метаболического паспорта человека, который представляет все промежуточные соединения обмена веществ в организме, предложили канадские ученые 12 апреля 2007 г. в своей статье «HMDB: the Human Metabolome Database» [26].



Рис. 8. База данных проекта «Метаболом человека»

Метаболом человека по своему фундаментальному значению подобен геному человека — совокупности всех его генов, или протеому — совокупности всех его про-

теинов. Это своего рода химический аналог генома. И если геном представляет программу жизни, то метаболом — ее ингредиенты. Изучение метаболома человека проводится по трем видам биологических жидкостей — сыворотки крови, мочи и спинномозговой жидкости. Ученые из Университета Альберты (University of Alberta) в Эдмонтоне каталогизировали и охарактеризовали 2 500 метаболитов, 1 200 лекарственных препаратов и 3 500 пищевых компонентов (рис. 9), обнаруженных в человеческом организме, и опубликовали эту работу в авторитетном журнале *Nucleic Acids Research* [26]. Авторы убеждены в том, что эти результаты знаменуют собой начало новой эры диагностики и обнаружения болезней. По их мнению, метаболомный проект окажет на медицину более существенное влияние, чем проект «Геном человека», поскольку метаболомы в качестве индикаторов здоровья и протекающих в организме физиологических процессов намного чувствительнее. «Метаболомы — это осведомители генома», — отметил руководитель проекта профессор вычислительной биологии Университета Альберты Дэвид Вишарт (David S. Wishart). По его подсчетам, единичная замена в ДНК человека может привести к 100-тысячекратному изменению в уровне метаболизма. А представитель «геномщиков» из того же университета доктор Дэвид Бейли (David Bailey) указывает также на значение метаболома для прогнозирования, предупреждения и мониторинга многих генетических, инфекционных и связанных с загрязнением окружающей среды заболеваний [27–32].

Метаболом находится в исключительной зависимости от того, что человек ест, где он живет, от времени суток, времени года, общего состояния его здоровья и даже от душевного состояния, — отмечается в документе, распространенном Университетом Альберты. Располагая в начале проекта химическими и биологическими данными о наиболее известных метаболитах человеческого организма и об их связи с тем или иным заболеванием, канадские ученые за два с половиной года собрали воедино сведения об оставшихся 95% метаболитов, получив таким образом черновой вариант человеческого метаболома. Доктор Д. Вишарт считает, что на сегодняшний день большая часть медицинских тестов основана на измерении метаболитов в крови и моче. По его оценке, в рутинных клинических анализах задействовано менее 1% известных метаболитов, в результате очень многое теряется из виду [27–32].

Расшифровка человеческого метаболома чрезвычайно важна и для понимания функций нормальной кишечной микрофлоры, поскольку важнейшей из них является участие в пищеварительных процессах организма человека [1, 2].

Проект «Геном человека» (Human Genome Project) имеет косвенное отношение к проектам, изучающим микробную экологию человека, поскольку геном собственно человеческих клеток содержит порядка 26 000 различных генов, в то время как общий геном кишечных микроорганизмов (обозначаемый как микробиом) — порядка 400–600 тыс. генов. Подавляющее большин-

а



<http://www.foodbs.org/foodb>

б



<http://www.drugbank.ca>

Рис. 9. Базы данных, используемые в проекте «Метаболом человека»:

- а — база данных пищевых компонентов;  
б — база данных лекарственных препаратов



ство генов эукариотических клеток человека имеет микробную или вирусную природу [1].

Перечень проектов, прямо или косвенно связанных с изучением микробной экологии человека и созданием пробиотиков, далеко не исчерпан. В данной работе представлены лишь наиболее масштабные и всемирно известные проекты.

Рассмотренные в работе данные свидетельствуют о возрастающем интересе к вопросу поддержания и восстановления нормальной микрофлоры всех биотопов организ-

ма человека не медикаментозным способом с использованием химических лекарственных средств, а с помощью рационального применения научных знаний о ее составе и функциях в норме и при патологии. Расшифровка микробиома и метаболома человека позволит быстро и эффективно диагностировать различный спектр заболеваний человека, связанных с его микрофлорой, а также проводить целевое эффективное лечение выявленных заболеваний с помощью пробиотиков, сконструированных на основе нормальной микрофлоры человека.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Шендеров Б. А. Функциональное питание и его роль в профилактике метаболического синдрома. — М.: ДеЛи Принт, 2008. — 319 с.
2. Широбоков В. П., Янковский Д. С., Димент Г. С. Микробна екологія людини з кольоровим атласом. Навч. посібник. — К.: ТОВ «Червона Рута-Турс», 2009. — 312 с.
3. *Society for Microbial Ecology and Disease* — [www.somed.nu](http://www.somed.nu).
4. Сафронова Л. А. 34-й Междунар. конгресс Общества микробной экологии и заболеваний (Йокогама, Япония, 20–23 ноября 2001 г.) // Микробиол. журн. — 2012. — Т. 74, № 1. — С. 64–65.
5. *International Science and Technology Center* — [www.istc.ru](http://www.istc.ru).
6. *Human Microbiome Project* — <http://www.hmpdacc.org>.
7. *Human Microbiome Project* — <http://nihroadmap.nih.gov/hmp>.
8. Turnbaugh P. J., Ley R. E., Hamady M. et al. The human microbiome project // *Nature*. — 2007. — V. 449. — P. 804–810.
9. *Human Microbiome Project* — <http://hmp.nih.gov/>.
10. Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 2004. — V. 68, N 4. — P. 669–685.
11. Gill S. R., Pop M., Deboy R. T. et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome // *Science*. — 2006. — V. 312. — P. 1355–1359.
12. Manichanh C., Rigottier-Gois L., Bonnaud E. et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach // *Gut*. — 2006. — V. 55. — P. 205–211.
13. Qin J., Li R., Raes J. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing // *Nature*. — 2010. — V. 464. — P. 59–65.
14. *MetaHIT Project* — <http://www.metahit.eu/>.
15. Gloux K., Leclerc M., Iliozer H. et al. Development of high-throughput phenotyping of metagenomic clones from the human gut microbiome for modulation of eukaryotic cell growth // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2007. — V. 73. — P. 3734–3737.
16. Jones B. V., Begley M., Hill C. et al. Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2008. — V. 105. — P. 13580–13585.
17. Zoetendal E. G., Rajilic-Stojanovic M., de Vos W. M. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota // *Gut*. — 2008. — V. 57. — P. 1605–1615.
18. Diaz-Torres M. L., Villedieu A., Hunt N. et al. Determining the antibiotic resistance potential of the indigenous oral microbiota of humans using a metagenomic approach // *FEMS Microbiol. Lett.* — 2006. — V. 258. — P. 257–262.
19. Daniel R. The metagenomics of soil // *Nat. Rev. Microbiol.* — 2005. — V. 3. — P. 470–478.
20. Gabor E. M., Alkema W. B., Janssen D. B. Quantifying the accessibility of the metagenome by random expression cloning techniques // *Env. Microbiol.* — 2004. — V. 6. — P. 879–886.
21. Dicksved J., Halfvarson J., Rosenquist M. et al. Molecular analysis of the gut microbiota of identical twins with Crohn's disease // *ISME J.* — 2008. — V. 2. — P. 716–727.
22. Arumugan M., Harrington E. D., Foerstner K. U. et al. SmashCommunity: a metagenomic annotation and analysis tool // *Bioinform.* — 2010. — V. 26, N 23. — P. 2977–2978.
23. Nagarajan N., Pop M. Review Sequencing and genome assembly using next-generation technologies // *Met. Mol. Biol.* — 2010. — V. 673. — P. 1–17.
24. Simon C., Daniel R. Review Achievements and new knowledge unraveled by metage-

- onomic approaches // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2009. — V. 85, N 2. — P. 265–276.
25. *Human Metabolome Project* — www.hmdb.ca.
26. *Wishart D. S., Tzur D., Knox G. et al.* HMDB: the Human Metabolome Database // Nucleic Acids Research. — 2007. — V. 35. — P. 521–526.
27. *German J. B., Hammock B. D., Watkins S. M.* Metabolomics: building on a century of biochemistry to guide human health // Metabolomics. — 2005. — V. 1. — P. 3–9.
28. *Hamosh A., Scott A. F., Amberger J. S. et al.* Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders // Nucl. Acids Res. — 2005. — V. 33. — P. D514–D517.
29. *Smith C. A., O'Maille G., Want E. J. et al.* METLIN: a metabolite mass spectral database // Ther. Drug Monit. — 2005. — V. 27. — P. 747–751.
30. *Wishart D. S., Knox C., Guo A. C. et al.* DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration // Nucl. Acid. Res. — 2006. — V. 34. — P. D668–D672.
31. *Dworzanski J. P., Snyder A. P., Chen R. et al.* Identification of bacteria using tandem mass spectrometry combined with a proteome database and statistical scoring // Anal. Chem. — 2004. — V. 76. — P. 2355–2366.
32. *Wishart D. S., Yang R., Arndt D. et al.* Dynamic cellular automata: an alternative approach to cellular simulation // In Silico Biol. — 2005. — V. 5. — P. 139–161.

## ОГЛЯД МІЖНАРОДНИХ ПРОЕКТІВ У ГАЛУЗІ МІКРОБНОЇ ЕКОЛОГІЇ ЛЮДИНИ ТА СТВОРЕННЯ ПРОБІОТИКІВ

*С. А. Старовойтова*

Національний університет  
харчових технологій, Київ, Україна

*E-mail: svetik\_2004@mail.ru*

У роботі охарактеризовано сучасні великомасштабні і всесвітньо відомі проекти, що стосуються вивчення мікробної екології людини та створення пробіотиків, а саме: «Товариство мікробної екології та захворювань», «Пробіотики і здоров'я. Цільова ініціатива», проекти «Мікробіом людини», MetaHIT, «Метаболом людини» і деякі інші. Подано коротку історичну довідку, а також посилання на офіційні сайти кожного з пропонувананих наукових проектів. Описано основні цілі й завдання кожного з них. Наведено коротку характеристику проектів і доступні на сьогодні результати досліджень щодо кожного з розглянутих наукових напрямів. Акцентовано увагу на важливості цих проектів для розширення наукових знань в галузі мікробної екології людини, а також з метою удосконалення та / або створення нових ефективних пробіотиків на основі представників нормальної мікрофлори кишечника людини. Показано тісний взаємозв'язок наукових даних, одержаних в ході реалізації проектів.

**Ключові слова:** пробіотики, міжнародні проекти в галузі мікробної екології людини.

## REVIEW OF INTERNATIONAL PROJECTS IN A FIELD OF HUMAN MICROBIAL ECOLOGY AND CONSTRUCTION OF PROBIOTICS

*S. A. Starovoitova*

National University of Food Technologies,  
Kyiv, Ukraine

*E-mail: svetik\_2004@mail.ru*

Modern huge and world-wide known projects concerning studying of human microbial ecology and construction of probiotics, particularly: Society for Microbial Ecology and Disease, Probiotics & Health Targeted Initiative of International Science and Technology Center (TI PROBIO ISTC), Human Microbiome Project of National Institutes of Health, MetaHIT Project (Metagenomics of the Human Intestinal Tract) of European Commission, Human Metabolome Project of Canadian University of Alberta and some more else were characterized in the article. Brief historical information and reference to official sites of every discussed project were given. Main goals and tasks of every project were described. Short characteristic of discussed projects and also modern accessible results of researches were given. Importance of every examined project for widening scientific knowledge in the field of human microbial ecology and also for improvement and/or for construction of modern effective probiotics on basis of human normal intestinal microflora were paid attention. Close interaction of scientific data received by realization of every discussed project was shown.

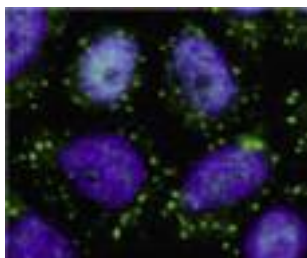
**Key words:** probiotics, international projects in human microbial ecology.

## Новий погляд на сигнальну мережу життєво важливого протеїну mTOR

Багато захворювань спричинено порушеннями у сигнальній системі mTOR. Тому точні знання про цю систему можуть дати вченим потужні інструменти у боротьбі з цими хворобами, зокрема, вони стосуються нових терапевтичних мішеней. Міхаель Галль (Michael Hall) з Біоцентру Базельського університету (Biozentrum of the University of Basel), Швейцарія, ідентифікував низку нових регуляторних протеїнів mTOR, у тому числі ензим, необхідний для синтезу будівельних блоків ДНК. Результати цієї роботи нещодавно опубліковано в журналі *Science*.

Протеїнова мішень рапаміцину ссавців (mammalian target of rapamycin, скорочено mTOR) контролює принципово важливі для організму процеси, що мають фундаментальне значення, — ріст і виживання клітин, їх міграцію та метаболізм. Як ключовий компонент двох комплексів — mTORC1 і mTORC2 — вона стимулює вироблення протеїнів і жирів та гарантує надходження в клітину достатньої кількості енергії. Порушення регуляції сигнальної мережі mTOR безпосередньо пов'язано з розвитком таких тяжких хвороб, як рак, діабет і серцево-судинні захворювання. Пошук раніше невідомих регуляторних протеїнів mTOR може дати нові підходи до лікування цих патологій

Виходячи з важливої ролі сигнальної мережі mTOR у клітині, вчені вважають, що багато протеїнів і процеси, які вона контролює, ще належить виявити. За допомогою сучасних технологій, так званої кількісної фосфопротеоміки, дослідницькій групі Галль на цей час вдалося виявити понад 300 нових молекулярних протеїнових мішеней mTOR, які виконують широкий спектр функцій.



Регуляторний протеїновий комплекс mTORC1 сприяє олігомеризації ензиму CAD. Зеленим показано олігомери CAD, синім — ДНК (фото: University of Basel / Biozentrum)

Зокрема, дослідники з'ясували, як саме mTORC1 контролює ріст і розмноження клітин: протеїни стимулюють утворення нуклеотидів — будівельних блоків генетичного матеріалу (ДНК і РНК), синтезованих у багатостадійних процесах із простіших молекул. Перші етапи біосинтезу нуклеотидів опосередковуються ензимом CAD. mTORC1 посилює асоціацію декількох молекул цього ензиму CAD у формі олігомерів, підвищуючи тим самим активність CAD і синтез нуклеотидів.

Одержані швейцарськими дослідниками дані свідчать про те, що багато функцій системи mTOR ще залишаються невідомими. Всебічне вивчення контрольованих нею сигнальних шляхів, а також наслідків порушень сигналіну є вкрай важливим для розуміння патологічних процесів і розроблення нових терапевтичних підходів до лікування. Дослідження професора Галль та його колег допомогло з'ясувати ще одну ланку в ланцюзі сигнальної системи mTOR.

Джерело:

<http://www.alphagalileo.org/ViewItem.aspx?ItemId=128731&CultureCode=en>

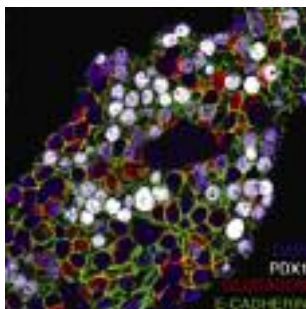
## Перепрограмування клітин для боротьби з діабетом

Упродовж багатьох років дослідники шукали спосіб лікування хворих на цукровий діабет, намагаючись відновити діяльність інсулінпродукуючих бета-клітин підшлункової залози. Дослідники університету Пенсильванії під керівництвом професора Клауса Кестнера (Klaus H. Kaestner) запропонували принципово новий підхід до вирішення цієї проблеми. Перепрограмування відповідних альфа-клітин у бета-клітини могло б дати новий і взаємодоповнювальний підхід для лікування цукрового діабету 2-го типу. Згідно з повідомленням, опублікованим в онлайн-випуску *Journal of Clinical Investigation*, оброблення клітин миші й людини сполуками, які змінюють матеріал ядра клітини — хроматин, спричинувало експресію в альфа-клітинах генів бета-клітин.

На думку Клауса Кестнера, це вкрай важливо для хворих на цукровий діабет, адже у них мало б стати більше інсулінпродукуючих бета-клітин і менше — глюкагонпродукуючих альфа-клітин. За діабету 2-го

типу не тільки бракує інсуліну, але й синтезується занадто багато глюкагону.

Загибель інсулінпродукуючих бета-клітин підшлункової залози є причиною розвитку цукрового діабету 1-го типу або ж це відбувається на виражених стадіях діабету 2-го типу. Обидва типи діабету зумовлені недостатньою кількістю інсулінпродукуючих бета-клітин. Теоретично трансплантація здорових бета-клітин має зупинити розвиток захворювання, проте вченим ніяк не вдається розробити ефективний метод вирощування цих клітин у лабораторних умовах ані з ембріональних, ані з індукованих плюрипотентних стовбурових клітин.



**Оброблення острівців Лангерганса підшлункової залози людини інгібітором метилтрансферази Adox сприяло тому, що багато альфа-клітин (червоного кольору) почали експресувати маркер бета-клітин — транскрипційний фактор PDX1 (білого кольору)** (фото: Nuria Bramswig, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania)

Альфа-клітини — це інший тип клітин у підшлунковій залозі. Їхня функція полягає в синтезі та вивільненні глюкагону — пептидного гормону, що підвищує рівень глюкози в крові.

Учені запропонували принципово новий підхід до вирішення цієї проблеми. Вони обробляли клітини острівців Лангерганса людини хімічною речовиною, що інгібує протеїн, який метилує гістони, а це, крім усього іншого, призводить до видалення деяких модифікацій у їхніх молекулах, що впливають на експресію генів. Гістони являють собою протеїнові комплекси, навколо яких нитки ДНК скручуються в ядрі клітини. Було зафіксовано високу частоту альфа-клітин, які експресували бета-клітинні маркери і після проведення медикаментозного лікування почали продукувати певну кількість інсуліну.

Вчені встановили, що багато генів у альфа-клітинах як активують, так і пригнічують модифікації гістонів. До них належать гени, які відіграють важливу роль у фун-

кціонуванні бета-клітин. Коли певний ген відключено, його можна легко активувати шляхом видалення домінуючої модифікації гістонів.

Кестнер вважає, що це відбувається через те, що альфа-клітини людини певною мірою перебувають у «пластичному» епігенетичному стані. Автори припустили, що цією особливістю можна скористатися для перепрограмування їх у бета-клітини.

*Джерела:*

[http://www.uphs.upenn.edu/news/News\\_Releases/2013/02/kaestner/](http://www.uphs.upenn.edu/news/News_Releases/2013/02/kaestner/)

<http://www.sciencedaily.com/releases/2013/02/130223111356.htm>

### Відкрито ген, що пригнічує вірус герпесу

Вірус герпесу, пов'язаний з розвитком саркоми Капоші (KSHV), і вірус Епштейн-Барр (EBV) є одними з найпоширеніших вірусів людини. У прихованій формі ними інфіковано переважну більшість людей, проте активний герпесвірус може стати причиною розвитку декількох форм раку. Прагнучи зрозуміти та, в кінцевому підсумку, розробити методику противірусного лікування, дослідники з Університету Північної Кароліни (University of North Carolina) ідентифікували родину генів людини, відомих як Тазлд-подібні кінази (Tousled-like kinases, TLK), що відіграють ключову роль у гальмуванні й активації герпесвірусів.

У статті, опублікованій в журналі *Cell Host and Microbe*, йдеться про результати, одержані дослідницькою групою під керівництвом д-ра Блоссом Даманія (Blossom Damania), співробітника відділу мікробіології та імунології і члена Комплексного онкологічного центру Лінебергер (UNC Lineberger Comprehensive Cancer Center). Вчені виявили, що гальмування ензиму TLK зумовлює активацію літичного циклу як вірусу Епштейн-Барр, так і герпесвірусу саркоми Капоші, під час якого ці віруси починають своє репродукування в організмі, стаючи чутливими до дії противірусних препаратів.

Д-р Даманія повідомив, що в присутності TLK віруси залишаються латентними, але за його відсутності вони здатні до репродукування.

Вірус Епштейн-Барр і герпесвірус, асоційований із саркомою Капоші, переносяться з кров'ю і в прихованій формі є більш ніж у 95% інфікованих людей, ускладнюючи лікування. Обидва віруси пов'язані з розвитком



різних форм лімфом, сарком і карцином; багато пацієнтів з пригніченою імунною системою наражаються на ризик розвитку онкологічних захворювань, асоційованих із цими вірусами.

Дослідники встановили, що стрес здатен активувати перехід вірусу з прихованої форми в активну, однак молекулярні основи циклу активації вірусу ще невідомі. Виявивши зв'язок між вірусами і ензимом ТЛК, вчені розпочали пошук молекулярних механізмів, що їх зумовлюють ситуації, подібні до стресу, а так само шляхів гальмування ензиму ТЛК. Д-р Даманія зазначив, що й дотепер ще точно не з'ясовано, що ж можна насправді вважати стресом на молекулярному рівні.

Зі встановленням факту, що ензим ТЛК пригнічує віруси, з'явилася можливість дослідження різних протеїнів як потенціальної лікарських препаратів проти онкологічних захворювань, асоційованих із вірусами. За нормального функціонування клітин ТЛК бере участь у підтриманні стабільності геному, репарації ДНК і збиранні хроматину, однак, що стосується функцій ТЛК, то багато з них ще невідомі. Тому одним з напрямів роботи вчених у майбутньому має стати дослідження функцій ТЛК за відсутності вірусу.

Якщо вдасться заблокувати дію ензиму і розробити на його основі лікарські препарати, які інгібують реплікацію вірусу, з'явиться можливість цілеспрямовано виліковувати клітини від вірусу. А за відсутності вірусу не розвиватиметься й асоційований з ним рак.

*Джерело:*

<http://concatenate-march.blogspot.com/2013/02/gene-that-suppresses-herpesviruses.html>

#### **Екстракт зеленого чаю запобігає формуванню амілоїдних бляшок, пов'язаних із розвитком хвороби Альцгеймера**

Учені з Мічиганського університету описали раніше невідому корисну дію зеленого чаю: здатність запобігати згортанню амінокислотної послідовності специфічних протеїнів у дефектну третинну структуру в головному мозку. Агрегація металоасоційованих амілоїдних протеїнів причетна до розвитку хвороби Альцгеймера та інших нейродегенеративних розладів. Більш докладний опис результатів проведеного дослідження

можна віднайти в журналі *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. У статті, опублікованій в цьому журналі, йдеться про дослідження Мі Хі Лім (Mi Hee Lim) з Інституту медико-біологічних проблем Мічиганського університету. Вона та її колеги використовували екстракт зеленого чаю для того, щоб проконтролювати утворення агрегатів металоасоційованого бета-амілоїду, пов'язаних з розвитком хвороби Альцгеймера, у лабораторних умовах.

Компонент чаю під назвою епігалокатехін-3-галат (ЕГКГ) запобігає утворенню агрегатів і руйнує існуючі агрегати протеїнових молекул, що містять атоми металів, зокрема міді, заліза, цинку.

Мі Хі Лім зазначила, що багато людей покладають великі надії на цю молекулу, і додала, що ЕГКГ та інші флавоноїди у складі натуральних продуктів вже давно описані як потужні антиоксиданти.

Хоча багато вчених і досліджує невеликі молекули і молекули металоасоційованого амілоїду, більшість з них, на думку Лім, звужує цю проблему. Вона вважає, що слід використовувати багато спільних дослідницьких підходів, оскільки мозок людини має дуже складну будову. За її словами, публікація в *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* має покласти початок проведенню таких досліджень. Наступним кроком, який планує здійснити її група, є «цілеспрямовання» ЕГКГ, потім перевірка здатності цієї сполуки протистояти утворенню бляшок в організмі плодкових мушок. Згодом вони мають намір модифікувати її для використання в головному мозку, зокрема аби запобігти утворенню бляшок, пов'язаних із хворобою Альцгеймера. Мі Хі Лім планує організувати спільну роботу з Бінг Йе (Bing Ye) — нейробіологом інституту медико-біологічних проблем. Учені збираються перевірити потенціал нової молекули для усунення можливої токсичності агрегатів, що містять протеїни і метали, в організмі плодкових мушок.

*Джерело:*

<http://sci-lib.com/article1727.html>

#### **Розроблено новий сенсор для метильованої ДНК**

Вчені з Інституту створення та розвитку нових технологій в галузі охорони здоров'я, відкритого на базі клініки Майо та Іллінойського університету в Урбані-Шампейн (США), розробили новий простий тест для



детектування метильованої ДНК. Метилуванням називається процес приєднання метильних груп до ДНК, який є одним зі способів регуляції експресії генів.

Джордж Васматзіс (George Vasmatazis), співкерівник програми дослідження біомаркерів при Центрі індивідуальної медицини, пояснив, що свого часу нанопори було досліджено на придатність до використання під час секвенування геному і скринінгового аналізу, натомість новим методом дослідження можна скористатися для оцінювання захворювань, що стосуються епігенетичних факторів. За його словами, розроблена методика може усунути необхідність проведення бісульфитної конверсії ДНК, полімеразної ланцюгової реакції і введення флуоресцюючої мітки.

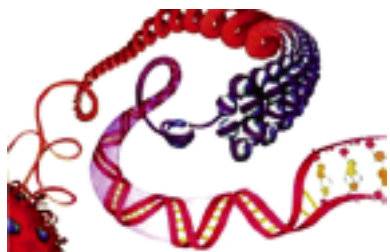


Фото із сайта [www.mednovelty.ru](http://www.mednovelty.ru)

Професор Рашид Башир (Rashid Bashir), біоінженер, завідувач лабораторії мікро-і нанотехнологій, співавтор проведеної роботи, співробітник Іллінойського університету в Урбані-Шампейн, зазначив, що наступним кроком має стати збільшення просторового розділення шляхом об'єднання більш тонких мембран і включення однакових підготовчих етапів.

Нанопора в даному разі — це дуже маленький за розміром отвір у штучній мембрані, який дає змогу проводити маніпуляції тільки з однією молекулою. Вчені вважають, що ця розробка є корисною, оскільки метилування в промоторних послідовностях може сигналізувати про розвиток новоутворення (стосовно більшості основних видів злоякісних пухлин) і слугувати ефективнішим біомаркером порівняно з багатьма іншими генетичними маркерами. На сьогодні вчені можуть відрізнити метильовану ДНК від неметильованої, додаючи протеїн до метильованих нуклеотидів у ході вимірювання іонного електричного струму за допомогою нанопор.

Джерело:

<http://sci-lib.com/article1736.html>

### Паливо для літаків, так само як і пластмаси, підвищує ризик розвитку низки захворювань у кількох поколіннях нащадків

Учені з Вашингтонського державного університету розширили список токсичних речовин у навколишньому середовищі, які можуть справляти негативний вплив на три покоління нащадків тварин, батьки яких мали схильність до такого впливу цих речовин.

Група дослідників на чолі з молекулярним біологом Майклом Скіннером (Michael Skinner) у статті, опублікованій в журналі *PLOS ONE*, повідомляють про розвиток репродуктивних захворювань та ожиріння у нащадків мишей, батьківських особин яких було піддано впливу бісфенолу А (BPA), діетилгексифталату (DEHP) та дибутилфталату (DBP). В іншій статті в журналі *Reproductive Toxicology* йдеться про те, що вчені вперше спостерігали розвиток у низки поколінь захворювань, зумовлених застосуванням вуглеводневої суміші під назвою JP8 (рідке паливо для військових літаків НАТО).

Проведені дослідження дали змогу проаналізувати процес розвитку ожиріння в результаті «епігенетичного трансгенераційного наслідування». Відомо, що тварини успадковують батьківські ознаки в результаті одержання батьківських ДНК. Окрім того, у передачі ознак важливу роль відіграє епігенетичне успадкування. Учені, які працюють в лабораторії Скіннера, протягом останнього року задокументували епігенетичні ефекти безлічі токсичних речовин, що містяться в навколишньому середовищі: пластмас, пестицидів, фунгіцидів, вуглеводнів.

Результати досліджень, опубліковані в журналі *PLOS ONE*, свідчать про «значний приріст» хвороб і аномалій у першому і третьому поколіннях нащадків (самців і самок) тварин, які зазнали впливу пластмас. Для першого покоління нащадків, материнські організми яких піддавалися прямому впливу токсиканта за вагітності, було характерним збільшення частоти хвороб нирки і простати новонароджених. У третьому поколінні виявлялися пубертатні аномалії, захворювання сім'яників і яєчників, ожиріння.

Також у процесі дослідження було виявлено близько 200 епігенетичних молекулярних маркерів, що дозволяють оцінити вплив різних чинників і можливість розвитку трансгенераційних захворювань. Ці маркери можна буде використовувати для створення діагностичних інструментів і нових методик лікування.

У рамках проведеного дослідження, результати якого опубліковано в журналі *Reproductive Toxicology*, вчені піддавали впливу суміші вуглеводнів самок вагітних щурів (у міру розвитку гонад плоду тварин). У результаті в першому поколінні нащадків виявляли збільшення нирок, аномалії простати, хвороби яєчників. У третьому поколінні спостерігали збільшену втрату примордіальних фолікулів, полікістоз яєчників, ожиріння.

На думку Майкла Скіннера, те, що прабабусі зазнавали впливу токсичних речовин, може бути причиною розвитку хвороби в нашому організмі, навіть якщо ми їй не піддаємося якомусь впливу. Це — негенетична форма успадкування, в якій не задіяна послідовність ДНК, але виявляється вплив чинників навколишнього середовища на її хімічну модифікацію.

Джерело:

<http://sci-lib.com/article1687.html>

#### **Фактор росту сприяє відновленню стовбурових клітин після радіаційного ушкодження**

Дослідники з Університету Дюка (Дарем, Північна Кароліна, США) під керівництвом професора Джона Чьюто (John Chute) встановили, що епідермальний фактор росту сприяв відновленню кровотворних стовбурових клітин після впливу радіації. Це відкриття може дати нові можливості для лікування онкологічних хворих і тих, хто постраждав від вибухів «брудних» бомб або в результаті ядерної катастрофи.

Результати досліджень опубліковано в журналі *Nature Medicine*, де повідомляється, що гемопоетичні клітини генетично модифікованих мишей, для кісткового мозку яких є характерним надлишковий синтез фактора росту епідермісу, захищені від згубної дії радіації.

Гемопоетичні (кровотворні) клітини кісткового мозку, функція яких полягає в постійному оновленні клітин крові, дуже чутливі до впливу радіації. Захист цих клітин або прискорення їх відновлення може сприяти поліпшенню стану пацієнтів, які перенесли трансплантацію кісткового мозку або опромінення під час проведення протипухлинної радіотерапії, а також унаслідок радіаційного ураження від випадкових впливів навколишнього середовища, таких як японська ядерна катастрофа в 2011 році.

Учені почали свої дослідження, використовуючи мишей з делеціями двох генів, від-

повідальних за загибель ендотеліальних клітин, які нашаровувалися на внутрішню поверхню кровоносних судин. Можна припустити, що вони беруть участь у регулюванні життєдіяльності гемопоетичних клітин. Кровоносні судини і система кровотворення таких мишей менше страждали від впливу великих доз радіації, що сприяло їх виживаності.

Аналіз секрету ендотеліальних клітин кісткового мозку таких тварин показав, що вміст у ньому фактора росту епідермісу (EGF) істотно (до 18 разів) перевищує показники, виявлені в сироватці контрольних мишей. Потім учені вирішили перевірити, чи дійсно EGF може безпосередньо стимулювати поділ гемопоетичних клітин у кістковому мозку опромінених мишей. Виявилось, що стимульована таким чином проліферація забезпечує одержання популяції клітин, що відновлюють стовбурові клітини тварин, кістковий мозок яких було попередньо зруйновано радіоактивним опроміненням.

Після цього автори проводили експерименти, під час яких вводили мишам, підготовленим до трансплантації кісткового мозку, три варіанти клітинних популяцій. Одній групі мишей вводили звичайні клітини кісткового мозку, другій — клітини кісткового мозку попередньо опромінених мишей, які отримали ін'єкцію фактора росту епідермісу, а третій — клітини кісткового мозку опромінених тварин, яким було введено фізіологічний розчин.

Найкращі результати відновлення кісткового мозку спостерігали у першій групі тварин. Однак у мишей, яким було пересаджено клітини від опромінених / оброблених EGF донорів, виявлено 20-разове збільшення швидкості приживлення їхніх клітин у кістковому мозку порівняно з мишами 3-ї групи, яким увели фізіологічний розчин.

Додаткові дослідження показали, що введення EGF поліпшувало виживаність тварин, опромінених високою дозою радіації, причому в групі мишей, яким після опромінення було зроблено ін'єкцію EGF, вижило 93%, тоді як у контрольній групі тварин, яким вводили фізіологічний розчин, — 53%.

За словами професора Чьюто, EGF пригнічує дію протеїну PUMA, який зазвичай призводить до загибелі стовбурових клітин після радіаційного опромінення. Він зазначив, що на сьогодні зроблено лише перші кроки до розуміння механізмів, за допомогою яких EGF стимулює відновлення стовбурових клітин після радіаційного ураження. Одержані результати дають підстави споді-

ватися, що в майбутньому EGF може стати засобом для прискорення відновлення системи кровотворення в онкологічних пацієнтів після хіміо- або радіотерапії.

Джерело:  
[www.sciencedaily.com/  
 releases/2013/02/130203145556.htm](http://www.sciencedaily.com/releases/2013/02/130203145556.htm)

### Транспозони впливають на вікові зміни головного мозку

У статті, опублікованій в журналі *Nature Neuroscience*, дослідники лабораторії Колд Спрінг Харбор (CSHL), які працюють під керівництвом проф. Джошуа Дабнау (Joshua Dubnau), повідомили, що в міру старіння плодів мушок (дрозофіл) у мозку відбувається збільшення кількості та активності так званих «стрибних генів» або транспозонів.

Відкриті в 1940-х рр. професором Барбарою МакКлінток (Barbara McClintock) в експериментах із клітинами зерен кукурудзи транспозони становлять переважно повторювані послідовності ДНК, здатні вбудовуватись у ДНК тварин і рослин.

Термін «стрибні гени» пов'язаний з тим фактом, що за активації транспозони можуть вставлятись або переміщатись з однієї частини геному в іншу. При цьому вони, як вважають, здатні викликати зміни функціонування генів, а в разі зародкових клітин спричинити потенційно летальні деструктивні порушення. Середня тривалість життя плодової мушки становить 40–50 днів. Однак ці комахи є цінною моделлю для вивчення генетики таких процесів, як старіння і функціонування мозку, зокрема процесу пам'яті.

Інтерес авторів до транспозонів був викликаний результатами експериментів, які показали, що за зниження активності протеїну (Argonaute 2) погіршувалася довготривала пам'ять, яку оцінювали за допомогою умовного рефлексу за Павловим — у реакції на запах. Як зазначив Дабнау, цей нейродегенеративний дефект значно посилюється у старіючих дрозодів.

Хоча, як було показано, транспозони були активні в процесі нормального розвитку мозку, надалі їхня активність не виявлялася. Це свідчить про їхню функціональну роль у цьому процесі.

Беручи до уваги участь протеїну Ago2 в захисті геному дрозодів від активності транспозонів, вчені дійшли висновку про необхідність подальшого з'ясування їхньої ролі.

Спостереження за поведінкою транспозонів у мозку дорослих дрозодів виявило знач-

не підвищення їхньої активності в нейронах починаючи з 21-денного віку. У міру старіння організму активність стабільно зростала, зумовлюючи переміщення їх усередині геному. Особливо активним виявився транспозон гурсу, який частіше переміщувався в геномі з місця на місце. Блокування активності гена Ago2 призводило до того, що активація транспозонів у мозку дрозодів починалася в більш ранньому віці. Це виявлялося відсутністю довгострокової пам'яті у таких особин вже в 20-денному віці, що не є характерним для нормальних мушок.



Електронна мікрофотографія плодової мушки (*Drosophila melanogaster*) з неправильними кольоровими очима. Художня інтерпретація з використанням накладення зображення показує локалізацію активних транспозонів у мозку дрозодів (зелений колір) (фото надано Josh Dubnau)

У більш ранній роботі, виконаній проф. Дабнау спільно з проф. Моллі Геммел (Molly Hammell) із CSHL, було встановлено взаємозв'язок між активністю транспозонів і тяжкими нейродегенеративними захворюваннями, зокрема ALS (бічний аміотрофічний склероз) і лобно-скроневою деменцією. Цей взаємозв'язок здійснюється протеїном TDP-43, що контролює активність транспозонів.

Порівнюючи ці дані з результатами нового дослідження, проф. Дабнау висловив припущення, що причиною вікової нейродегенерації, а також порушень, що спостерігаються за низки нейродегенеративних захворювань, може бути своєрідний «шторм транспозонів». Проте дотепер не з'ясовано, чи є транспозони причиною або наслідком пов'язаних зі старінням дефектів мозку. Проф. Дабнау зазначив, що наступним кроком має стати активація транспозонів за генетичної маніпуляції плодів мушок та з'ясування, чи є вони прямою причиною нейродегенеративних захворювань.

Джерело:  
[http://www.sciencedaily.com/releases/  
 2013/04/130408103338.htm](http://www.sciencedaily.com/releases/2013/04/130408103338.htm)



**Власні клітини шкіри пацієнтів  
трансформовано у клітини серця  
для створення  
«захворювання в чашці Петрі»**

Більшість пацієнтів зі спадковим захворюванням серця під назвою аритмогенна дисплазія правого шлуночка/кардіоміопатія (ARVD/C) до 20-річного віку навіть не підозрюють про його наявність у них. Незначна кількість симптомів ARVD/C у молодому віці ускладнює дослідження особливостей розвитку і розроблення методів його лікування.

Новий метод на основі використання стовбурових клітин, розроблений в 2012 р. під керівництвом лауреата Нобелівської премії Шинія Яманака (Shinya Yamanaka), допомагає вирішити цю проблему. Застосовуючи цю технологію, дослідники можуть створювати клітини серцевого м'яза із власних клітин шкіри пацієнта. Однак більшість одержуваних клітин серця в основному є незрілими. Тому питання про те, чи можна використовувати клітини цього типу для відтворення захворювання, що виникає в зрілому віці, досі залишається відкритим.

У статті, опублікованій в журналі *Nature*, уперше викладено спосіб моделювання захворювання ARVD/C «у чашці Петрі». Цю модель було створено з використанням технології Яманаки і нового інноваційного методу, що дає змогу імітувати раннє «дозрівання» клітин. Тому вона, найімовірніше, є більш актуальною для людини із захворюванням ARVD/C порівняно з іншими моделями і краще підходить для вивчення цієї хвороби та дослідження нових методів лікування.

Вчені з Медичного дослідницького інституту Сенфорд-Бернгам (Sanford-Burnham Medical Research Institute), США, і Університету Джона Гопкінса (Johns Hopkins University), США, уперше описали спосіб моделювання «захворювання в чашці Петрі». На думку проф. Х'юей-Шен Вінсент Чен (Huei-Sheng Vincent Chen) з Інституту Сенфорд-Бернгам, головного автора дослідження, важко довести, що моделювання «захворювання в чашці Петрі» клінічно релевантне захворюванню в зрілому віці. Однак є підстави для висновку, що виявити це захворювання можна тільки тоді, коли індукується метаболізм, який виникає в зрілому віці. Це є важливим відкриттям, оскільки симптоми ARVD/C зазвичай не виявляються до юнацького віку. Проте в розглянутому випадку йдеться про стовбурові клітини, які є ембріональними за своєю природою. Наразі немає методів лікування

з метою запобігання прогресуванню ARVD/C, цього рідкісного захворювання, що зачіпає переважно спортсменів. Отримана ж модель дає надію на розроблення подібних методів. З метою одержання унікальних клітин пацієнта із захворюванням ARVD/C група вчених у лабораторних умовах спочатку отримала зразки шкіри пацієнтів з ARVD/C, клітини якої містять кілька мутацій, асоційованих із розвитком захворювання. Потім вони застосували метод, запропонований Яманакою — внесли в клітинну культуру молекули, які дали змогу повернути їх у стан стовбурових клітин, тобто створити так звані індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (iPSCs). Згодом ученим вдалося перетворити iPSCs на невичерпне джерело специфічних клітин серцевого м'яза пацієнта. Ці клітини мали значною мірою ембріональну природу, але в їхньому генетичному апараті зберігалися оригінальні мутації пацієнта.

Однак майже рік учені марно намагалися виявити будь-які ознаки ARVD/C у клітинах серцевих м'язів. Без наявності фактичних ознак ARVD/C у дорослому віці ці молоді специфічні клітини серцевого м'яза пацієнта неможливо було б використовувати для дослідження захворювання або тестування нових лікарських засобів.

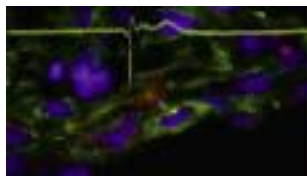
***Випереджаючи час***

Урешті-решт спроби, зроблені вченими, увінчалися успіхом. Було виявлено, що метаболічна зрілість є основою для викликання ознак ARVD/C, хвороби дорослих, в їхніх ембріональноподібних клітинах. Як основне джерело енергії фетальні клітини серцевого м'яза людини використовують глюкозу (цукор). На відміну від них, для виробництва енергії клітини серцевого м'яза дорослої людини використовують жир. Таким чином, групі вчених під керівництвом Чена вдалося створити суміш, яка здатна у цій моделі спричинювати зрушення метаболізму в дорослому організмі.

Після багатьох проб і помилок вчені виявили, що в основі ARVD/C-захворювання лежить метаболічна дисфункція. Крім того, команді Чена вдалося змусити індивідуальні серцеві м'язові клітини поводитися так само, як у хворих на ARVD/C серця. Домогтися такого ефекту в клітинах допомогла штучна гіперактивація протеїну під назвою PPAR. Раніше вчені асоціювали розвиток ARVD/C з наявністю ослаблених контактів між клітинами серцевого м'яза, що спостерігається тільки у половини пацієнтів



з ARVD/C. Але за допомогою розробленої моделі вчені не тільки викликали початок захворювання в дорослому організмі в лабораторних умовах, але й виявили нові потенційні мішені, призначені для лікування хворих на ARVD/C.



У цьому дослідженні вчені використовували клітини шкіри пацієнтів, хворих на ARVD/C, щоб отримати індуковані плюрипотентні стовбурові клітини, які потім було трансформовано в специфічні клітини серцевого м'яза (зображені на фотографії зеленим кольором). Одержані серцеві клітини є дуже потрібною для фахівців моделлю, що відтворює «захворювання в чашці Петрі», і їх можна використовувати для дослідження ARVD/C і тестування нових методів лікування (фото: Sanford-Burnham Medical Research Institute)

### Що далі?

Група вчених під керівництвом Чена нещодавно отримала новий грант з Каліфорнійського інституту регенеративної медицини (California Institute for Regenerative Medicine) на створення додаткових моделей ARVD/C на основі iPSC. Використовуючи велику кількість моделей ARVD/C, вони визначатимуть у всіх (або, принаймні, у більшості) пацієнтів розвиток захворювання, перебіг якого пов'язаний з тими самими метаболічними дефектами, що їх виявлено в проведеному і описаному дослідженні.

Вчені також планують провести доклінічні дослідження для розроблення нових методів лікування цієї небезпечної хвороби серця.

Джерело:

<http://www.sciencedaily.com/releases/2013/01/130127134201.htm>

### Фізкультура не рятує м'язи від старіння

Відкриття, зроблене вченими Університету Лафборо (Loughborough University), Великобританія, під керівництвом професора Джеймі Тіммонсона (Jamie Timmons) не тільки ставить під сумнів давнє поширене переконання, що фізична активність уповільнює процес старіння м'язової тканини, але й дає новий погляд на процеси старіння в організмі людини.

Джеймі Тіммонс, професор системної біології у Спортивній школі фізичних вправ і медичних наук, зазначив, що тепер одержано докази, які повністю спростовують вчення про старіння організму. Проведені дослідження доводять відсутність прямого зв'язку між старінням м'язів і відсутністю фізичних вправ. Досі вважали, що однією з основних проблем старіння є атрофія м'язової тканини. Проте, вивчаючи вікові зміни у м'язах у людей (з Великобританії і США), змін, пов'язаних із фізичною активністю, не спостерігали.

Автори встановили, що реакція організму людини на фізичні навантаження варіює в дуже широких межах, і її можна прогнозувати, виходячи з початкового стану генів. На думку проф. Тіммонса, на деяких людей фізичні навантаження можуть мати позитивний функціональний вплив, тимчасом як у інших осіб вони не зупиняють втрати м'язової маси, оскільки м'язи просто не ростуть. Тобто можна констатувати, що чіткого зв'язку між старінням м'язів і відсутністю фізичних вправ немає.

Вчені мали на меті знайти гени, що контролюють старіння у людей, із застосуванням класичних методів генетики (аналіз ДНК). У рамках проведених досліджень шляхом вимірювання варіацій кількості синтезованих у клітинах протеїнових продуктів різних генів було складено відтворений молекулярний профіль або так звані хімічні «відбитки пальців», характерні для старіння м'язової тканини людини. Дослідники зіставили результати проведеного аналізу з численними існуючими даними, що стосуються ефектів фізичних тренувань, аби з'ясувати, яким чином різні хімічні профілі реагують на тренування і витривалість. Метою цього була ідентифікація молекулярних процесів, переважно асоційованих зі старінням, а не із впливом навколишнього середовища або способу життя. У результаті було виявлено унікальні генетичні механізми, асоційовані з ростом і старінням м'язів людини. Більш того,



Колаж із сайту Університету Лафборо — Veronique Duboc and Thery Lepage, Observatoire Oceanologique de Villefrance-sur-Mer

на підставі отриманих даних автори дійшли висновку, що молекулярні процеси, пов'язані зі старінням м'язової тканини, не мають нічого спільного із процесами, які безпосередньо регулює фізична активність. Іншими словами, вплив віку на м'язи не взаємопов'язаний зі впливом фізичних навантажень.

На цей час учені розробляють різні теорії старіння, що пов'язані, зокрема, із запаленням та окиснювальним стресом або вільними радикалами, вивчаючи людей з уже існуючими захворюваннями або на підставі проведення генетичних досліджень.

На думку проф. Тіммонса, попри те, що деякі з припущень можна виключити, важливо, що, за його розрахунками, через 10 років у результаті проведених досліджень буде розроблено новий препарат, який уповільнюватиме процес старіння у людей зі швидким зниженням функцій м'язів. Тіммонс заявив, що його група має намір продовжувати роботу, кінцевою метою якої є створення препарату, що зможе уповільнювати швидкість старіння м'язів і допомогатиме людям, нездатним нарощувати м'язову масу за допомогою звичайних тренувань.

Джерело:

[http://www.lboro.ac.uk/service/publicity/news-releases/2013/47\\_ageing.html](http://www.lboro.ac.uk/service/publicity/news-releases/2013/47_ageing.html)

### Сік китайського гіркового гарбуза запобігає розвитку раку підшлункової залози у піддослідних мишей

Результати досліджень, проведених в Інституті раку при університеті Колорадо, які опубліковано в журналі *Carcinogenesis*, свідчать, що екстракт гіркового китайської гарбуза обмежує здатність клітин пухлин підшлункової залози метаболізувати глюкозу, знижуючи тим самим енергетичний запас цих клітин і, в кінцевому підсумку, спричинюючи їх загибель.



Китайський гіркий гарбуз (*Bitter melon*)  
(фото: [www.sciencedaily.com](http://www.sciencedaily.com))

Проф. Раджеш Агарвал (*Rajesh Agarwal*), один із керівників програми з контролю розвитку злоякісних пухлин Центру вивчення злоякісних новоутворень при університеті Колорадо, співробітник кафедри фармакології фармацевтичного факультету, констатує, що три роки тому дослідники вже продемонстрували дію екстракту, отриманого з китайського гіркового гарбуза, на клітини ракової пухлини молочної залози, які перебували в чашках Петрі. Але в новому дослідженні вчені пішли набагато далі. Використовуючи сік, який жителі різних регіонів, зокрема Азійського континенту, вживають у їжу, вони встановили, що цей сік впливає на засвоєння глюкози клітинами, зменшуючи їхні енергетичні запаси і зумовлюючи таким чином їх загибель.

Проф. Агарвал вирішив перевірити результати вже проведених досліджень. Зазвичай цукровий діабет має тенденцію до розвитку раку підшлункової залози. Було показано, що китайський гіркий гарбуз здатен впливати на перебіг цукрового діабету 2-го типу. Упродовж століть його використовували в народній медицині Китаю та Індії саме для лікування цукрового діабету. Беручи це до уваги, проф. Агарвал і його колеги вирішили безпосередньо дослідити зв'язок між раком підшлункової залози і вживанням китайського гіркового гарбуза.

За повідомленням Агарвала, було описано зміни метаболічних процесів, що відбуваються у клітинах підшлункової залози, уражених злоякісною пухлиною, і виявлено активацію АМФ-активованої протеїнкінази — ензиму, який зменшує запас енергії в клітинах.

Можливо, зовсім не випадково китайський гіркий гарбуз регулює секрецію інсуліну бета-клітинами підшлункової залози. Після проведення досліджень на клітинних культурах Раджеш Агарвал і його колеги показали, що в піддослідних мишей, у яких був рак підшлункової залози і яких годували соком китайського гіркового гарбуза, рак розвивався на 60% рідше (порівняно з частотою виникнення хвороби у контрольній групі).

Проф. Агарвал вважає це дуже цікавим відкриттям. Адже багато вчених намагаються розробити препарати, які пригнічують здатність ракових клітин забезпечувати себе енергоресурсами, тимчасом як, виявляється, існує здатна на це речовина природного походження.

Джерело:

<http://www.sciencedaily.com/releases/2013/03/130312134920.htm>

## Протеїновий баланс запобігає розвитку раку

Два протеїни, що, як вважали раніше, виконують однакові функції, насправді є антагоністами, і підтримка певної рівноваги між активністю цих протеїнів є ключем до вирішення проблеми низки захворювань, зокрема онкологічних. Такого висновку дійшли вчені з онкологічного центру Фокс-Чейз (Fox Chase), Філадельфія, США. Результати проведеної ними наукової роботи опубліковано в журналі *Developmental Cell*. Одержані дані свідчать про можливість використання нових речовин, які здатні протистояти розвитку онкологічних захворювань, впливаючи на метаболічні шляхи, відповідальні за підтримання належного балансу між згаданими вище протеїнами.

Автор дослідження проф. Девід Л. Уїст (David L. Wiest) пояснив, що зараз вони намагаються зрозуміти, як можна втрутитися в цю систему з терапевтичною метою, аби відновити порушений баланс.

Дві протеїнові молекули, Rpl22 і Rpl22-like1, які задіяні в процесі синтезу інших протеїнових молекул, кодуються двома однаковими генами. Тому багато вчених і вважали, що ці молекули виконують в організмі однакові функції. Однак група дослідників під керівництвом професора Уїста встановила, що це не відповідає дійсності. Зазначені протеїни не просто виконують різні функції — вони є антагоністами стосовно один одного.

У рамках проведеного дослідження Девід Уїст і його колеги гальмували активність Rpl22 в організмі рибок Даніо-реріо — модельного організму, який застосовують для вивчення хвороб людини в лабораторних умовах. За відсутності Rpl22 в організмі Даніо-реріо не виробляються Т-лімфоцити. Така сама аномалія спостерігається у разі гальмування активності Rpl22-like1. Це свідчить про те, що ці протеїни необхідні для того, щоб стовбурові клітини слугували джерелом Т-лімфоцитів.

Коли вчені спробували відновити Т-лімфоцити в модельному організмі рибок, у яких була нестача Rpl22, додаючи Rpl22-like1, то в них нічого не вийшло. Те ж саме відбувалось і в ситуації, коли в організмі було недостатньо Rpl22 і пригнічувався протеїн Rpl22-like1. На підставі отриманих результатів проф. Уїст і його колеги зробили висновок, що ці протеїни виконують різну функцію, незважаючи на те, що вони беруть участь у створенні стовбурових клітин.

Аби глибше вивчити функції розглянутих протеїнів, учені проаналізували вміст різних протеїнів, що беруть участь у створенні стовбурових клітин, за умови відсутності або Rpl22, або Rpl22-like1. За відсутності Rpl22-like1 у клітинах відзначається знижений рівень протеїну Smad1 — головного фактора, що визначає розвиток стовбурових клітин. Натомість, коли відсутній Rpl22, різко зростає вміст Smad1.

Професор Уїст пояснює, що як Rpl22, так і Rpl22-like1 можуть зв'язуватися безпосередньо з клітинною РНК, на матриці якої синтезується Smad1. Отже, ці протеїни підтримують баланс у створенні стовбурових клітин через антагоністичний вплив на експресію Smad1.

За образним висловом учених, Rpl22 можна порівняти з «гальмом», а Rpl22-like1 — з «педаллю газу», що працюють з метою одержання стовбурових клітин. При цьому вони мають бути використані належним чином, тобто якщо активність того чи іншого занадто висока, відбувається порушення балансу сил, що регулює вироблення стовбурових клітин, з потенційно смертоносними наслідками.

Зокрема, за надто високого вмісту Rpl22 («гальма») припиняється виробництво стовбурових клітин, унаслідок чого зменшується кількість клітин крові, що призводить до таких проблем, як анемія. З другого боку, занадто високий вміст Rpl22-like1 («педаль газу») може зумовити перевиробництво стовбурових клітин, що призводить до лейкемії.

Проведені дослідження показали, що рівень вмісту Rpl22-like1 зазвичай перевищує у разі розвитку ракових захворювань, включаючи 80% випадків гострого мієлолейкозу. З другого боку, дослідники виявили, що за інших ракових захворювань ген, який кодує Rpl22, видалається. Будь-якої із цих подій достатньо для того, аби змінити баланс у виробництві стовбурових клітин шляхом, який призводить до захворювання на рак.

Джерело:

[http://www.sciencedaily.com/  
releases/2013/02/130227162020.htm](http://www.sciencedaily.com/releases/2013/02/130227162020.htm)

### «Фармацевтичний» підхід збільшує екстракцію олії з водоростей

Застосувавши підхід, аналогічний тому, який використовують для пошуку нових лікарських препаратів, хіміки з Каліфорнійського університету в Девісі (США) ви-



явили низку сполук, здатних значно збільшити вилучення олії із зелених мікроскопічних водоростей, які є потенційним джерелом біодизеля та інших екологічно чистих видів палива. Результати роботи опубліковано в онлайн-овому випуску журналу *Chemical Biology*.

Мікроскопічні водорості — це одноклітинні організми, що, як і зелені рослини, використовують фотосинтез для засвоєння вуглекислого газу, перетворюючи його на складні сполуки, включаючи олії та ліпіди. Морські водорості можна вирощувати в ставках, наповнених солоною водою. Вони не конкурують із продовольчими культурами за посівні площі або прісну воду.

Аннеліза Франц (Annaliese Franz), автор опублікованої статті, зазначила, що ці водорості можуть жити в солоній воді, використовувати сонячне світло та діоксид вуглецю як будівельний компонент, продукувати олії, придатні для переробки з метою одержання біодизельного палива.

Група дослідників протестувала вплив 83 сполук на ріст чотирьох штамів мікродоростей та одержання олій. Результати їхніх досліджень показали, що деякі вивчені хімічні сполуки здатні збільшити на 85% виробництво олій без зниження швидкості росту мікродоростей.

Серед найбільш активних сполук виявили звичайні антиоксиданти, такі як епігалокатехінгалат, що міститься в зеленому чаї, бутилгідроксіанізол (ВНА) — харчовий консервант.

Учені проводили експерименти з вирощування культури об'ємом до півлітра. Фахівці підраховали, що деякі аналізовані ними хімічні сполуки могли би бути економічно ефективними з погляду витрат, якщо збільшити обсяг їх одержання у водоймі, де ростуть водорості. В умовах експерименту олії екстрагували з водоростей. При цьому залишалася маса, яку можна обробити і застосувати як корм для тварин або в інших цілях.

Аннеліза Франц вважає, що з огляду на важливість використання таких водоростей для одержання біопалива слід розпочати розроблення методів для створення нових лікарських препаратів із сполук, що впливають на метаболізм мікродоростей.

Завдання полягає в пошуку малих молекул, які можуть справляти вплив на метаболічні шляхи у клітині. Створюючи велику кількість клітинних культур і здійснюючи вимірювання простим зчитуванням, можна буде проводити на місці скринінг великої кількості різних сполук у короткі терміни.

Більш докладний опис результатів проведеного дослідження можна віднайти на веб-сторінках журналу *Chemical Biology*.

Джерело:

<http://sci-lib.com/article1756.html>

### Кишкові бактерії, пов'язані з метаболізмом холестеролу

Дослідники із Сальгрєнської академії Гетеборзького університету (Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg), Швеція, дійшли висновку, що метаболізм холестеролу регулюють бактерії, що живуть у тонкому кишечнику. Результати цього дослідження можуть бути корисними для розроблення нових лікарських препаратів, спрямованих на боротьбу із хворобами серцево-судинної системи.



*Escherichia coli* — бактерія, що живе в кишечнику людини

(Фото: [www.universityofcalifornia.edu](http://www.universityofcalifornia.edu))

Добре відомо, що холестерол — це основний фактор ризику розвитку серцево-судинних захворювань. Він синтезується в організмі людини і надходить в організм з їжею, а далі у печінці перетворюється на жовчні кислоти, які потім виділяються в кишечник, виводяться з організму або повертаються назад у печінку.

Вплив кишкових бактерій на здоров'я людини і захворювання є галуззю досліджень, що швидко розвивається. Дослідницька група проф. Фредріка Бекгеда (Fredrik Bäckhed) з Університету Гетеборга, яка є лідером у цій галузі, вивчає, як кишкові бактерії пов'язані зі способом життя і такими захворюваннями, як ожиріння, діабет і серцево-судинні патології. У статті, опублікованій в журналі *Cell Metabolism*, дослідники повідомили, що бактерії кишечника пригнічують синтез жовчних кислот, використовуючи для цього сигнальну систему, в якій бере участь конкретний протеїн, відомий як рецептор FXR в тонкому кишечнику. За словами Семі Сеїн (Sama Sayin), одного з авторів проведеного нещодавно



дослідження із Сальгренської академії Гетеборзького університету, було виявлено, що лікарські препарати, які знижують вміст холестеролу, істотно скоротили смертність унаслідок розвитку серцево-судинних захворювань. Ці дослідження можна вважати кроком уперед, оскільки вдалося показати, яким чином бактерії, що живуть у кишечнику, регулюють синтез жовчних кислот із холестеролу.

FXR-рецептори беруть участь не тільки в регуляції метаболізму холестеролу, але й обміну жирів і вуглеводів.

Проф. Бекгед, під керівництвом якого проводять ці дослідження, сподівається, що якщо в майбутньому вдасться виявити конкретну групу бактерій, які впливають на сигнальні шляхи за участю FXR-протеїнів, то, ймовірно, цю інформацію можна буде використовувати для створення нових засобів лікування цукрового діабету і хвороб серцево-судинної системи.

Джерело:

<http://www.sciencedaily.com/releases/2013/02/130218092558.htm>

#### У несприятливих умовах бактерії стають стійкими до дії антибіотиків

У статті, опублікованій в журналі *BMC Evolutionary Biology* у відкритому доступі, повідомляється, що за несприятливих умов бактерії набувають стійкості до дії антибіотиків в умовах стресу. Зокрема, бактерії виду *E. coli*, які ростуть за підвищеної температури, стають стійкими до дії рифампіцину.

Прийнято вважати, що стійкість до дії антибіотиків — це складний для мікроорганізму процес. Наприклад, мутації, які можуть забезпечити зниження кількості надходження антибіотика, також можуть зменшити кількість поживних речовин, що надходять у клітину. Отже, за відсутності антибіотиків нерезистентні бактерії витіс-



Скупчення бактерій *E. coli*  
(Фото: [www.bioweb.uwlax.edu](http://www.bioweb.uwlax.edu))

нятимуть резистентні. Дослідники з Каліфорнійського університету Ірвайна (UC Irvine), США, спільно з французькими колегами медичного факультету Деніса Дідро (Faculté de Médecine Denis Diderot), Париж, виявили, що в несприятливому середовищі, наприклад за зростання в умовах високої температури, у бактерій може спонтанно розвиватися стійкість до дії рифампіцину.

Мутації, відповідальні за появу цієї стійкості, в різних штаммах бактерій *E. coli* призводять до виникнення різних ефектів. У кожному типі вивчених бактерій змінена в результаті мутації субодиниця генов РНК-полімерази давала їм змогу рости в присутності рифампіцину. Але на відміну від вихідного тестового штаму бактерій, мутантні штами не обов'язково мали перевагу в рості, перебуваючи в умовах високої температури.

Д-р Олівер Тенайллон (Olivier Tenaillon), під керівництвом якого проводили ці дослідження, зазначив, що стійкість до дії антибіотиків може виникати навіть за відсутності антибіотиків, і що залежно від типу бактерій та умов росту стійкість може бути навіть корисною. Враховуючи, що рифампіцин використовують для лікування тяжких захворювань бактеріальної природи, наприклад туберкульозу, а також гансеніозу, для запобігання менінгококовому менінгіту, явище стійкості до дії антибіотиків за відсутності самих антибіотиків має велике значення для охорони здоров'я.

Результати досліджень однозначно показали, що еволюція стійкості до дії антибіотиків відбувається під впливом двох типів взаємодії генів: плейотропії та епістазу. Як пояснив д-р Аржан де Віссер (Arjan de Visser) з Вагенінгенського університету (Wageningen University), Нідерланди, плейотропія показує, як мутації, що забезпечують стійкість до дії антибіотиків, впливають на інші функції, зокрема на їхню поведінку в інших середовищах. Епістаз пояснює, наскільки добре поєднуються різні мутації, а також як вони впливають на стійкість до дії антибіотиків і, отже, визначає, які мутаційні шляхи будуть сприятливішими для еволюції в тому разі, коли для вироблення повної стійкості потрібне поєднання кількох мутацій.

Джерело:

<http://www.sciencedaily.com/releases/2013/02/130221194045.htm>

**У геномі морської міноги  
вчені виявили гени,  
пов'язані з неврологічними порушеннями  
у людини**

Група фахівців із лабораторії біології моря (Marine Biological Laboratory — MBL) виявила в геномі морської міноги кілька генів, які пов'язані з розвитком неврологічних розладів людини, включаючи хвороби Альцгеймера, Паркінсона, ураження спинного мозку. Дані про розшифрований геном цього організму опубліковано в журналі *Nature Genetics*.

Дженніфер Морган (Jennifer Morgan) із Центру регенеративної біології та тканинної інженерії Юджина Белла при Центрі MBL (MBL's Eugene Bell Center for Regenerative Biology and Tissue Engineering) пояснив, що морських міног можна використовувати як модельні організми для розширення існуючих уявлень про молекулярну природу нейродегенеративних хвороб і неврологічних розладів людини. Кінцевою метою є з'ясування того, що саме відбувається з нейронами після uszkodження і під час хвороби. Потрібно також зрозуміти причину змін у роботі нейронів під час розвитку захворювань та визначити шляхи корекції цих порушень з метою відновлення нормальної роботи нервової системи. На відміну від людини, морська мінога має незвичайну здатність до регенерації тканин нервової системи. У разі uszkodження спинного мозку міноги відбувається відновлення нервових клітин, наприклад, за розриву спинного мозку втрачені функції відновлюються упродовж 10–12 тижнів.

Дженніфер Морган з колегами із MBL спільно з Оне Блум (Ona Bloom) і Джозефом Баксбаум (Joseph Vuxbaum) вивчають



**Морська мінога (*Petromyzon marinus*)** є агресивним паразитом, який вважають шкідником у багатьох регіонах, у тому числі в районі Великих озер, США. Оскільки мінога є раннім предком давніх хребетних, для неї відомо повна послідовність геному (фото: New York State Department of Environmental Conservation)

явище регенерації тканин спинного мозку міноги з 2009 р. Нейрони головного та спинного мозку міног мають великий розмір і легко ідентифікуються, що робить їх відмінною моделлю для вивчення регенерації на рівні однієї клітини. Наразі інформація про гени міног дала змогу вченим глибше зрозуміти природу регенеративних механізмів і порівняти процеси, зокрема запалення, з фізіологічними процесами, що відбуваються в організмі людини.

Проект дослідження геному міноги здійснювала група з 59 дослідників під керівництвом Веймінг Лі (Weiming Li) з Мічиганського університету і Джереми Сміт (Jeremiah Smith) з Університету Кентуккі, США. Вчені зосередили свою увагу на вивченні тієї частини геному, яка визначає життєдіяльність нейронів.

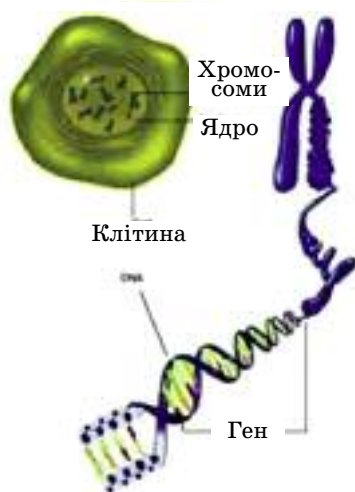
У міног, на відміну від людини, відсутні мієлінові волокна. В організмі людини вони утворюють оболонку, яка покриває нервові волокна і дає можливість прискорювати проведення нервових імпульсів. Однак фахівці виявили в організмі міног гомологічні гени, які кодують структуру протеїну мієліну. В організмі людини мієлінасоційовані молекули заважають відновленню uszkodженої нервової тканини. У разі uszkodжень спинного мозку велику увагу приділяють нейтралізації активності цих молекул. Таким чином, виникає парадоксальна ситуація: що роблять виявлені мієлінасоційовані гени в геномі тварин, у яких немає мієлінових волокон? І постають нові цікаві запитання: а може, організм людини колись теж мав здатність до регенерації втрачених тканин нервової системи? Якщо це так, то чому ця здатність зникла і чи можна її взагалі відновити?

Наразі Дженніфер Морган спільно з колегами аналізують, які гени і в якій послідовності активуються після uszkodження спинного мозку і в ході його відновлення.

**Джерело:**  
<http://www.sciencedaily.com/releases/2013/02/130224142915.htm>

**Протеїни, які в надлишку містяться  
в ракових клітинах, спричинюють  
суперспіралізацію ДНК**

Вчені з Університету Південної Каліфорнії, США, виявили протеїн, який може змінювати топологію ДНК, змушуючи цю молекулу згортатися в «суперспіраль». Відкриття дає нове уявлення про роль протеїнів під назвою



ДНК у клітині еукаріотів  
(Фото: [www.publications.nigms.nih.gov](http://www.publications.nigms.nih.gov))

МСМ (від англ. Mini-chromosome maintenance protein complex) у ракових клітинах, в яких міститься велика їх кількість.

Це можна уявити таким чином: якщо скручувати один кінець гумової нитки і при цьому нерухомо утримувати другий кінець. Після деякої кількості поворотів утворюється щільна структура. Якщо продовжувати згортати кінець вже закрученої нитки, то структура почне згортатися навколо себе, утворюючи щільний вузол. Подібним чином можуть бути згорнуті в суперспіралізовані структури й молекули ДНК. Хромосомна ДНК формує різноманітні суперспіралізовані структури, що дають можливість забезпечити перебіг низки важливих процесів. Формування цих структур призводить до включення і виключення деяких генів, а також регуляції роботи інших генів. Результати проведеного дослідження показують, що надлишок структур у клітині може призводити до гіперекспресії, зниження активності або виключення низки важливих генів, змушуючи клітини безконтрольно ділитись або перетворюватись на злоякісні.

Проф. Ксяоджань Чень (Xiaojiang Chen) з коледжу гуманітарних і природничих наук Девіда при Університеті Південної

Каліфорнії (USC Dornsife College of Letters, Arts and Sciences), США, автор проведеного дослідження, пояснив, що структура хромосомної ДНК відіграє важливу роль у регуляції експресії генів, а отже, й фізіологічного стану клітини. Зміна топології ДНК є одним з ефективних способів регуляції структури хромосомної ДНК. Виявлення здатності МСМ змінювати топологію ДНК дає змогу абсолютно по-новому оцінити роль МСМ в регуляції роботи генів і розвитку злоякісних пухлин.

Результати досліджень опубліковано в онлайн-випуску журналу *Nucleic Acids Research*.

Вчені виявили, що МСМ-протеїни формують нитки, які нагадують широку трубку, уздовж внутрішньої стінки якої спіралізуються нитки ДНК. Із середини трубка, утворена МСМ-протеїнами, має вигляд широкого спірального каналу, що несе сильний позитивний електричний заряд.

Проф. Чень зазначив, що така специфічна особливість є незвичайною і тому має виконувати спеціальну функцію. Широкий спіральний канал притягує і пов'язує нитка ДНК, яка має негативний заряд фосфатного остова.

Щільне закріплення ДНК на поверхні закрученого каналу всередині спіральної трубки нитки з МСМ-протеїнів змушує суперспіралізовуватись у подвійний ланцюг ДНК. Подальші дослідження вчених з Університету Південної Каліфорнії допоможуть з'ясувати, як зміни топології ДНК, спричинені активністю МСМ-протеїнів, впливають на утворення ракових клітин, а також уточнити можливість застосування цих змін для лікування злоякісних новоутворень.

Джерело:  
<http://www.sciencedaily.com/releases/2013/03/130311151250.htm>

Матеріал підготувала  
О. С. Виноградова

# НОВІ ПУБЛІКАЦІЇ З БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА СУМІЖНИХ ДИСЦИПЛІН



## REGENESIS: HOW SYNTHETIC BIOLOGY WILL REINVENT NATURE AND OURSELVES

Перебудова: як синтетична біологія змінюватиме природу,  
приспосовуючись під ці зміни

*G. M. Church, E. Regis*

У монографії описано можливості та здобутки у галузі синтетичної біології, яка вибірково змінює живі організми, модифікуючи значну частину геному, унаслідок чого створюються абсолютно нові види. Досі природа була виключно арбітром життя, смерті та еволюції. З появою синтетичної біології з'явився потенціал для опису нашого власного біологічного майбутнього. Дійсно, як показують автори, виникла навіть можливість переглянути ключові моменти еволюції життя і завдяки методам цієї науки вибирати різні її шляхи на відміну від наданих самою природою. Тобто, можлива повномасштабна перебудова геному — від відродження мамонтів та інших вимерлих організмів до створення дзеркальних форм життя з молекулярною структурою, протилежною нашій. Ці технології будуть спрямовані передусім на поліпшення здоров'я людини, підвищення інтелекту, поліпшення пам'яті і навіть подовження тривалості життя.

Обсяг: 304 стор.

Видавництво: «Basic Books» (США).

Дата публікації: 2012 р.

Мова: англ.



## LIVELY CAPITAL: BIOTECHNOLOGIES, ETHICS, AND GOVERNANCE IN GLOBAL MARKETS (EXPERIMENTAL FUTURES)

Потенціал живого: біотехнологія, етика і управління у глобальному вимірі  
(перспективи експериментальних досліджень)

*K. S. Rajan*



У книзі досліджено взаємозв'язок між біотехнологією, етикою, маркетингом, а також розглянуто сучасні правові, соціальні, культурні та інші аспекти, що виникають за врегулювання питань, що стосуються біотехнології, геноміки, фармацевтичного маркетингу, інтелектуальної власності, науки про довкілля, клінічних випробувань, захисту прав пацієнтів. Книга торкається не лише проблеми комерціалізації науки про життя, але й епістемологічної будови та системи оцінювання.

Обсяг: 528 стор.

Видавництво: «Duke University Press Books» (США).

Дата публікації: 2012 р.

Мова: англ.



## MICROBIAL BIOTECHNOLOGY: PRINCIPLES AND APPLICATIONS

Мікробіологічна біотехнологія:  
теоретичне значення і практичне використання

*Y. K. Lee*

Методи молекулярної біології, які швидко розвиваються, істотно впливають на мікробіологічну біотехнологію, що зумовило потребу в залученні нових авторів до 3-го видання цього підручника. Подано, зокрема, приклади з реального життя, що стосуються використання мікробіологічно-біотехнологічних принципів як у наукових дослідженнях, так і в промисловості. Може слугувати довідковим посібником для наукових працівників, студентів, аспірантів, викладачів.

Обсяг: 860 стор.

Видавництво: «World Scientific Pub Co Inc» (США).

Дата публікації: 2012 р.

Мова: англ.





## RISK MANAGEMENT APPLICATIONS IN PHARMACEUTICAL AND BIOPHARMACEUTICAL MANUFACTURING

Програма управління ризиками у фармацевтичному і біофармацевтичному виробництві

*H. Mollah, H. Baseman, M. Long*

Книга містить як теоретичні основи, так і практичні рекомендації з управління ризиками у фармацевтичному виробництві біопрепаратів. Охоплює тематичні дослідження і конкретні приклади використання принципів управління ризиками для розроблення біологічних і фармацевтичних препаратів, а також бібліографічні посилання, що будуть корисними для всіх, хто бажає отримати додаткові відомості з цих питань.

**Обсяг: 432 стор.**

**Видавництво: «Wiley» (США).**

**Дата публікації: 2013 р.**

**Мова: англ.**



## DOWNSTREAM INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY: RECOVERY AND PURIFICATION

Низхідна промислова біотехнологія: відновлення та очищення

*За редакцією М. С. Flickinger*

Планування процесу перероблення справляє найбільший вплив на загальну вартість біовиробництва, адже не тільки біохімічний склад різноманітних продуктів (наприклад, пептиди, протеїни, гормони, антибіотики і складні антигени) зумовлює використання різних методів виділення і очищення цих продуктів, але й забруднювальні побічні продукти також можуть зменшити загальний технологічний вихід і мати серйозні наслідки для безпеки та ефективності.

У монографії розглядаються такі питання:

- руйнування клітинних стінок і лізис;
- відновлення клітин центрифугуванням та фільтрацією;
- пористі середовища в біотехнології;
- обладнання, використовуване у промисловому очищенні протеїнів;
- афінна хроматографія;
- агрегація протеїнів, осадження і кристалізація;
- ліофільне сушіння біопрепаратів.

Призначена для фахівців у галузі промислової біотехнології, біохімії, промислової мікробіології, технології експресії генів і культивування клітин, а також для викладачів, студентів старших курсів, аспірантів.

**Обсяг: 872 стор.**

**Видавництво: «Wiley» (США).**

**Дата публікації: 2013 р.**

**Мова: англ.**



## UPSTREAM INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY, 2 VOLUME SET

Висхідна промислова біотехнологія, у 2 томах

*М. С. Flickinger*

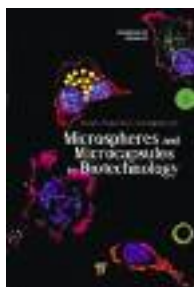
Біотехнологія — важлива галузь дослідження, і для багатьох університетів розроблено спеціальні навчальні програми, що стосуються цієї галузі. У пропонованому 2-томному посібнику містяться ретельно підібрані статті з енциклопедії Уїллі стосовно промислової біотехнології, біопроектів, біорозділення і клітинних технологій (Wiley's Encyclopedia of Industrial Biotechnology, Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology), а також включено нові статті (близько 80), які широко й на високому рівні висвітлюють ці питання.

**Обсяг: 1854 стор.**

**Видавництво: «Wiley» (США).**

**Дата публікації: 2013 р.**

**Мова: англ.**



**MICROSPHERES AND MICROCAPSULES IN BIOTECHNOLOGY:  
DESIGN, PREPARATION AND APPLICATIONS**

**Мікросфери і мікрокапсули в біотехнології:  
розробка, одержання і використання**

*G. Ma, Z.-G. Su*

Розглянуто нові мікросфери і мікрокапсули, спеціально розроблені й підготовлені для застосування в галузі біотехнології та біофармацевтики з використанням біореакцій, біорозділення, біообробки, біодетекції та інших нових біологічних методів. Подано відомості про принципи проектування, методи підготовки та застосування результатів досліджень нових мікросфер і мікрокапсул у кожній галузі біології. У довіднику обговорюються проблеми, які потребують подальшого вивчення, та вміщено коментарі щодо перспектив використання мікросфер і мікрокапсул.

**Обсяг: 552 стор.**

**Видавництво: «Pan Stanford Publishing» (Сінгапур).**

**Дата публікації: 2013 р.**

**Мова: англ.**



**BIOTECHNOLOGY OF NEGLECTED AND UNDERUTILIZED CROPS**

**Біотехнологія забутих і не до кінця використаних культур**

*За редакцією S. M. Jain, S. D. Gupta*

Це видання є першим у світовій практиці ґрунтовним посібником, в якому висвітлено наукові досягнення в галузі сільськогосподарської біотехнології, документально оформлено результати досліджень за останні три десятиліття, розглянуто поточний стан і перспективи на майбутнє.

**Обсяг: 592 стор.**

**Видавництво: «Springer» (Німеччина).**

**Дата публікації: 2013 р.**

**Мова: англ.**



**THE MYCOTA. GENETICS AND BIOTECHNOLOGY**

**Гриби. Генетика і біотехнологія**

*За редакцією U. Kück*

Із часу виходу 1-го видання деякі дослідження, присвячені молекулярній біології грибів, зокрема проекти вивчення геному грибів, набули стрімкого розвитку. Це у свою чергу вплинуло на фундаментальну генетику, а також біотехнологію. Для висвітлення цих подій друге видання було повністю оновлено і всі розділи переглянуто. Крім того, включено п'ять нових розділів, присвячених різним аспектам молекулярної генетики грибів. Вони охоплюють такі теми: ядро і позаядерна генетика; функціональна геноміка; біотехнічна генетика; дріжджі та міцеліальні гриби.

**Обсяг: 456 стор.**

**Видавництво: «Springer» (Німеччина).**

**Дата публікації: 2013 р.**

**Мова: англ.**



**APPLIED GENETICS OF LEGUMINOSAE BIOTECHNOLOGY  
(FOCUS ON BIOTECHNOLOGY)**

**Прикладна генетика біотехнології бобових (з акцентом на біотехнологію)**

*За редакцією P. K. Jaiwal, R. P. Singh*

Бобові включають багато важливих культурних рослин, які постачають вкрай необхідні протеїни в раціон людей і тварин у всьому світі. Вони мають унікальну здатність фіксувати атмосферний азот, пов'язаний з бульбочковими бактеріями роду *Rhizobia*, підвищують родючість ґрунту і займають певну важливу нішу в сільському господарстві. У двох томах пропонованого видання наведено новітні дані аналізу *in*

*in vitro* і технологій рекомбінантних ДНК для поліпшення зернових і кормових бобових. Розглянуто поточний стан і перспективи методів регенерації *in vitro*, генетичної трансформації та стабільності трансгенної модифікації ознак майже для всіх важливих бобових (соя, арахіс, горох, квасоля, нут, калянус; люцерна, маш, урд; адзукі, сочевиця, чина, люпин, лотос, люцерна, боби та ін.), а також способи їх удосконалення.

**Обсяг: 344 стор.**  
**Видавництво: «Springer» (Німеччина).**

**Дата публікації: 2013 р.**  
**Мова: англ.**



**PROTEINS IN SOLUTION AND AT INTERFACES:  
METHODS AND APPLICATIONS IN BIOTECHNOLOGY AND MATERIALS  
SCIENCE (WILEY SERIES ON SURFACE AND INTERFACIAL CHEMISTRY)**

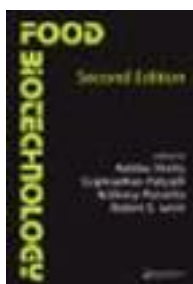
**Протеїни в розчині й на межі розділення:  
методи і застосування в біотехнології та матеріалознавстві  
(серія Wiley, що стосується хімії поверхні, межі розділення)**

*За редакцією J. M. Russo, A. Pieiro*

Протеїни в розчині й на межі розділення дедалі частіше використовують у нових технологіях – від одержання біоміметичних матеріалів до формування нанорозмірних частинок. У книзі проаналізовано стан цієї галузі, подано всебічний сучасний аналіз методів, застосовуваних для характеристики протеїнів, а також розглянуто найважливіші сфери їх використання. Висвітлені теми охоплюють протеїни і протеїнові агрегатні структури, методи розрахунку та вивчення структури протеїнів, агрегації та адсорбції; стан протеїнів у нестандартних умовах, а також біотехнологічні аспекти.

**Обсяг: 512 стор.**  
**Видавництво: «Wiley» (США).**

**Дата публікації: 2013 р.**  
**Мова: англ.**



**ENGINEERING ASPECTS OF FOOD BIOTECHNOLOGY  
(CONTEMPORARY FOOD ENGINEERING)**

**Технічні аспекти харчової біотехнології  
(Сучасна техніка харчової промисловості)**

*За редакцією J. A. Teixeira, A. A. Vicente*

Досягнення у харчовій біотехнології стосуються виробництва і поліпшення харчових інгредієнтів, генетичних аспектів і біологічних процесів, зокрема вивчення ензимів і клітин. Попри те, що ці досягнення та програми традиційно добре висвітлюються у публікаціях, існує брак інформації стосовно технічних аспектів біотехнології виробництва харчових продуктів. Пропонована книга містить вичерпний огляд цих питань — від розроблення технології харчових процесів і продуктів до найважливіших елементів харчової біотехнології.

**Обсяг: 375 стор.**  
**Видавництво: «CRC Press» (Велика Британія).**

**Дата публікації: 2013 р.**  
**Мова: англ.**

## **ПЕРЕДПЛАТА — 2013**

З питань організації передплати в **Україні**, оформлення замовлень та обробки передплатної документації звертайтеся, будь ласка, до

**1. «Каталогу видань України»:**

Підписний індекс 37796.

**2. Передплатного агентства «Укрінформнаука»:**

тел. / факс +38 (044) 239-64-57, моб. +38 (050) 154-77-83.

Електронна пошта: [innovation@nas.gov.ua](mailto:innovation@nas.gov.ua).

Поштова адреса: вул. Володимирська, 54, кімн. 144, м. Київ-30, 01601.

З питань організації передплати в **Росії** звертайтеся, будь ласка, до компанії «Інформнаука»:

тел. 8 (495) 787-38-73, факс: 8 (499) 152-54-81.

Електронна пошта: [perova@viniti.ru](mailto:perova@viniti.ru)

Поштова адреса: ТОВ «Інформнаука», вул. Усієвича, 20, м. Москва, 125190, Росія.



Ви можете оформити передплату або придбати свіжі номери журналу «Biotechnologia Acta» в електронній бібліотеці PressPoint: [www.presspoint.ua](http://www.presspoint.ua)



