

Київський національний університет
технологій та дизайну

МОНОГРАФІЯ

Інноваційні матеріали та технології:
**БІОТЕХНОЛОГІЯ,
ПРИКЛАДНА ХІМІЯ,
ЕКОЛОГІЯ**

ТОМ I



Київ 2025

Ministry of Education and Science of Ukraine

Kyiv National University of Technologies and Design
Faculty of Chemical and Biopharmaceutical Technologies

**ADVANCED MATERIALS AND TECHNOLOGIES:
BIOTECHNOLOGY, APPLIED CHEMISTRY,
ECOLOGY**

Volume I

MONOGRAPH

2025

УДК 001.895-03:[608.32:502.131.1:54-027.22

I-66

Рецензенти:

Бессарабов Володимир Іванович – д-р техн. наук, проф., директор Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л. М. Литвиненка НАН України;

Мережко Ніна Василівна – д-р техн. наук, проф., завідувач кафедри товарознавства та митної справи Державного торговельно-економічного університету.

Рекомендовано до видання

*Вченою радою Київського національного університету
технологій та дизайну*

(Протокол № 5 від 23 грудня 2025 р.)

I-66 Інноваційні матеріали та технології: біотехнологія, прикладна хімія, екологія: моногр. Т. 1 / за заг. ред. Мокроусової О. Р., Плаван В. П., Київ: КНУТД, 2025. 308 с.

ISBN 978-617-7763-57-3

У колективній монографії представлено результати сучасних наукових пошуків та практичні здобутки у сферах біотехнологій, хімічної інженерії та екологічної безпеки. Книга орієнтована на широке коло фахівців – від студентів профільних спеціальностей до досвідчених науковців та галузевих експертів.

УДК 001.895-03:[608.32:502.131.1:54-027.22

Публікується в авторській редакції

ISBN 978-617-7763-57-3

© О. Р. Мокроусова, В. П. Плаван, 2025

© КНУТД 2025

UDC 001.895-03:[608.32:502.131.1:54-027.22

I-66

Reviewers:

Volodymyr Bessarabov – Doctor of technical sciences, Professor, Director of the L.M. Lytvynenko Institute of Physical-Organic and Coal Chemistry;

Nina Merezhko – Doctor of Sciences, Professor, Head of the Department of Commodity Science and Customs Affairs of State University Of Trade And Economics.

Recommended for publication

*By the Academic Council of Kyiv National University
of Technologies and design of Ministry of Education and Science of Ukraine
(Protocol № 5 dated December 23 2025)*

I-66 Advanced materials and technologies: biotechnology, applied chemistry, ecology: monograph. Vol. 1; edited by Mokrousova O. R., Plavan V. P., Kyiv: KNUTD, 2025. 308 p.

ISBN 978-617-7763-57-3

This collective monograph presents the results of contemporary scientific research and practical achievements in the fields of biotechnology, chemical engineering, and environmental safety. The book is intended for a wide range of specialists, from students in relevant fields to experienced scientists and industry experts

UDC 001.895-03:[608.32:502.131.1:54-027.22

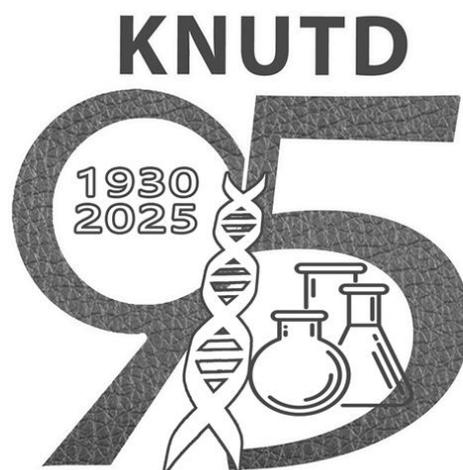
Published in the author's version

ISBN 978-617-7763-57-3

© O. R. Mokrousova, V. P. Plavan, 2025

© KNUTD, 2025

РОЗДІЛ 1
БІОТЕХНОЛОГІЯ



1.1 ARTIFICIAL INTELLIGENCE EMPOWERS THE DEVELOPMENT OF MATERIALS IN NEW PHARMACEUTICAL ENGINEERING: SCREENING AND APPLICATION OF POLYMER NANOPARTICLES

Jia Wei¹, Ihor Hretskyi²

¹School of Chemical Engineering, Ocean and Life Sciences,
Dalian University of Technology, China

²Kyiv National University of Technologies and Design, Ukraine
vjia1939@163.com, ihorhretskyi@gmail.com

With the rapid development of nanomedicine, polymer nanoparticles, as an important component of drug delivery systems, have great potential in improving drug stability, targeting and therapeutic effects. However, the traditional development model of polymer nanoparticles relies heavily on empirical trial and error, and is confronted with challenges such as high cost, long cycle and complex process. In recent years, the rapid development of artificial intelligence (AI) technology has provided revolutionary solutions to break through these bottlenecks. This paper systematically reviews the latest progress of artificial intelligence technologies such as deep learning and active learning in the design, screening and application of polymer nanoparticles, with a focus on analyzing how AI significantly reduces research and development time and costs through big data modeling and computational simulation. The article also explores the challenges and future directions faced by AI – driven new nanomedicine development platforms, providing theoretical references for the in – depth application of artificial intelligence in pharmaceutical engineering.

Keywords: Deep Learning, Active Learning, Polymeric Nanoparticles, Drug Delivery

Nanomedicine is a cutting – edge interdisciplinary field that utilizes carriers such as lipid, polymer, and inorganic nanoparticles to deliver diagnostic or therapeutic drugs, making it a major development direction in modern medicine. Among these, polymer nanoparticles play a critical role in drug delivery systems due to their controllable size, functionalized surface, and excellent biocompatibility. However, this field faces numerous challenges in clinical translation: less than 5% of nanoparticle systems advance to clinical trials, and nearly 75% of these candidates fail to obtain final drug approval [1]. This high failure rate stems partly from the inefficiency of the traditional trial – and – error development model, which is poorly suited to address the complexities of multi – parameter nanoparticle optimization.

However, the development of materials for traditional drug delivery has long faced multiple challenges. First, it is essential to balance multiple parameters simultaneously, including particle size distribution, drug loading capacity, release curve, and stability. Second, the extensive trial – and – error experimentation incurs high R&D costs. Finally, the transition from laboratory to clinical practice has an

exceedingly low success rate. Most candidate nanomedicines fail during preclinical stages owing to low delivery efficiency or high toxicity.

The rise of artificial intelligence (AI) technology in recent years has provided novel solutions to these challenges. By leveraging big data modeling, deep learning algorithms, and active learning, AI can elucidate the structure – property relationships of nanomaterials from massive datasets, predict the properties of candidate molecules, and significantly accelerate the optimization process [2]. Particularly in the development of polymer nanoparticles, AI has been applied throughout the entire pipeline – from molecular and carrier design to the detection of molecular content in vivo – demonstrating great potential as a disruptive technology.

We critically review the latest progress in leveraging artificial intelligence for lipid nanoparticle screening and application. Our analysis dissects the implementation strategies of key algorithms like deep learning and active learning, explores future research trajectories and challenges, and seeks to inform and inspire future studies in nanomedicine development.

The current shortcomings in the research and development of nanoparticles

The research and development of lipid nanoparticles (LNPs) originated from a breakthrough that addressed a key bottleneck in their use as drug carriers [3]. By designing «ionizable lipids» that become positively charged in acidic environments yet neutral at physiological pH, and utilizing microfluidic technology for efficient and uniform preparation, researchers successfully solved three major problems of nucleic acid delivery: encapsulation, stable in vivo delivery, and efficient release into the cytoplasm [4, 5]. The maturity and successful application of this technology were signaled by the first siRNA drug, Onpattro, and the mRNA vaccines that played a decisive role in the global COVID – 19 pandemic. Today, lipid nanoparticles have risen from a cutting – edge technology to a revolutionary drug delivery platform. Their applications are rapidly expanding into broader fields such as gene editing, cancer treatment, and protein replacement therapy, continuously driving innovation in biomedicine.

The development of polymer nanoparticles is a typical multi – parameter optimization problem. Key attributes, such as particle diameter, directly affect in vivo circulation time, tissue permeability, and cellular uptake efficiency. The loading and release behavior of active ingredients are closely related to the polymer's chemical structure, hydrophilicity – hydrophobicity balance, and degradation rate.

Traditional methods usually adopt a one – variable – at – a – time strategy, which is not only inefficient but also fails to capture the complex, non – linear interactions among factors. The entire process involves high investment and relies heavily on the experience and luck of researchers, becoming a shackle that restricts the rapid development of new materials.

The application of key artificial intelligence technologies in the new generation of pharmaceutical engineering

Artificial intelligence technology is constantly transforming the R&D paradigm of traditional pharmaceutical engineering, especially in the field of

polymer nanoparticle development. The integration and innovation of multiple AI algorithms have greatly enhanced the efficiency and accuracy of material development. These technologies have reduced the reliance on expensive experimental trial and error, lowering research and development costs and time, and providing a brand – new path for the efficient design of nanomedicines.

Deep learning and big data processing

Deep learning, as an important branch of artificial intelligence, builds multi – layer neural networks and automatically extracts complex features from massive data to establish nonlinear mapping relationships between input and output. In the development of polymer nanoparticles, deep learning models have been widely applied in multiple aspects such as the identification of nanoparticles, the development of antioxidant liposome delivery systems, and the production of PLGA nanoparticles [6 – 8].

Integration of Molecular Simulation and Machine Learning

Molecular simulation provides a fundamental framework for understanding the microscopic behavior of polymer nanoparticles. Computational methods—including all – atom molecular dynamics (AA – MD), coarse – grained molecular dynamics (CG – MD), dissipative particle dynamics (DPD), and Monte Carlo (MC) simulations—span a wide spatiotemporal range, from angstroms to micrometers and picoseconds to milliseconds.^[9] These techniques can elucidate the self – assembly mechanisms of nanoparticles, drug encapsulation processes, and their interactions with biological membranes.

Taking pH – responsive polymer carriers as an example, molecular simulations can precisely capture changes in intermolecular interactions resulting from the protonation/deprotonation of pH – sensitive groups [9]. This capability allows for predictions of nanoparticle structural instability and the kinetics of drug release. By simulating polymer conformational changes under varying pH conditions, researchers can optimize the selection and distribution of acid – sensitive groups, thereby designing intelligent nanosystems for targeted drug release within the tumor microenvironment.

The deep integration of machine learning with molecular simulation has further accelerated design efficiency. For instance, one study combined quantum chemical calculations with DPD to systematically investigate the self – assembly of PLGA – PEG – PLGA triblock copolymers at different concentrations [10]. As the copolymer concentration increased, the self – assembled structures transitioned from core – shell spherical micelles to onion – like, columnar, and ultimately lamellar structures. Analysis of this morphological evolution provides a theoretical basis for the precise design of drug delivery vectors rooted in molecular – level interactions.

The application of active learning and generative AI

Active learning, an efficient machine learning strategy, has demonstrated significant potential for optimizing drug combinations. To address the vast combinatorial space in traditional combination therapy development, an active learning framework employing fine – grained optimization and Gaussian process regression can predict drug efficacy and associated uncertainty. This approach can

identify optimal conditions with relatively few experimental iterations, significantly reducing the experimental burden while maintaining high accuracy [11].

Meanwhile, generative AI has pioneered a new paradigm for nanomedicine design through inverse design strategies. For instance, the Protein Corona Generative Adversarial Network (PC – GAN) can design nanoparticle surfaces with ideal protein adsorption profiles by manipulating latent space representations. Generative models like Generative Adversarial Networks (GANs) can virtually create novel nanostructures, substantially expanding the candidate material search space [2]. When integrated with automated experimental platforms, such systems form a complete «design – test – optimization» closed loop, accelerating the development of safe and effective nanomedicines.

The practical application of AI in the Design of Polymer nanoparticles

Artificial intelligence technology transcends a mere theoretical framework for polymer nanoparticle development, achieving significant breakthroughs in real – world implementation. Across drug – vector screening, nucleic acid delivery system design, and formulation process optimization, AI – driven solutions are pushing the boundaries of development efficiency—ultimately laying the foundation for next – generation precision medicine.

Intelligent Screening of Drug – vector combinations

Compatibility screening between drugs and carrier materials is a key step in the development of polymer nanoparticles, directly affecting the drug loading capacity, stability, and release characteristics. Traditional methods require numerous experiments to evaluate the performance of different combinations, which is time – consuming, labor – intensive, and inefficient. The introduction of AI technology, especially computation – driven virtual screening platforms, has greatly accelerated this process [12]. This AI – driven screening strategy has multiple advantages: First, it can quickly filter out molecules that do not conform to drug – like properties through drug – likeness screening, narrowing the candidate range. Second, it evaluates the theoretical binding affinity between the drug and the carrier through binding energy calculation, screening out combinations with strong interactions [13].

Furthermore, it assesses the safety and clinical application prospects of candidate molecules through computational toxicity prediction [14]. Finally, only the most promising combinations are experimentally validated, which greatly saves experimental resources and time.

Similar AI – driven methods have also achieved success in screening other types of nanocarriers, establishing a closed – loop process from molecular generation and property prediction to formulation determination [15]. The core advantage of this platform lies in its continuous learning and evolution capabilities, which can constantly expand the data repository for nanodelivery and improve screening efficiency.

Optimal Design of PLGA Nanoparticles

Poly(lactic acid – glycolic acid) copolymer (PLGA), as an FDA – approved biodegradable material, is one of the most widely studied polymers in drug

delivery systems. However, the preparation of PLGA nanoparticles involves multiple variables, such as molecular weight, lactic acid – to – glycolic acid ratio, and surface modification, making the traditional optimization process time – consuming and laborious.

Researchers explored the application of machine learning to predict the size of PLGA nanoparticles. When establishing the model, various inputs—including both categorical and numerical parameters—were considered to predict the optimal preparation conditions for drug delivery applications. This method employed the Leave – One – Out (LOO) method for feature transformation, the Local Outlier Factor (LOF) for outlier detection, and the Bat Optimization Algorithm (BA) for hyperparameter optimization.

A comparative analysis was performed among several integrated methods, including K – Nearest Neighbors (KNN), Bagging (Bootstrap Aggregating), and Adaptive Boosting (AdaBoost), as well as a novel BAT – Optimized KNN Regression (SBNNR) model, which uses generative adversarial networks and deep feature extraction to improve performance on sparse datasets.

The results show that ADA – KNN outperformed other models in predicting particle size, with a test R^2 of 0.94385. SBNNR demonstrated relatively high accuracy in predicting zeta potential, with a test R^2 of 0.97674. These findings emphasize the effectiveness of combining advanced preprocessing, optimization, and ensemble techniques for robust regression modeling. The contributions of this work include developing the SBNNR model, verifying the optimization capability of BA, and conducting a comprehensive evaluation of ensemble methods. This approach provides a reliable framework for using machine learning in materials science, particularly in nanoparticle characterization [16].

AI Development of Carrier – free Nanomedicines

Carrier – free nanomedicines represent a new generation of technology that bypasses traditional chemically synthesized carriers, instead achieving efficient drug loading through molecular self – assembly. This approach offers significant advantages, including low toxicity, high drug loading capacity, and a simplified manufacturing process. However, its development has long been hampered by challenges such as the low efficiency of drug combination screening and poorly understood molecular assembly mechanisms.

The introduction of artificial intelligence (AI) is now transforming this field. A strategy termed «AI – driven carrier – free drug design,» proposed by the team led by Xing Zhou, employs machine learning models to rapidly assess the self – assembly potential of drug molecules, substantially shortening the R&D cycle [15]. This method considers not only the physicochemical complementarity between drugs but also incorporates molecular descriptors and energy parameters, thereby enhancing prediction accuracy.

Experimental validation confirms that carrier – free nanomedicines developed based on AI predictions exhibit outstanding therapeutic efficacy in animal models. For instance, the long – circulating nanomedicine PiPTX achieves twice the tumor drug accumulation of its free – drug counterpart. Meanwhile, the

active – targeting agent LiDOX, leveraging the synergy between immunotherapy and chemotherapy, reduces tumor weight to one – fifth of that observed with conventional treatments. These successes underscore the immense potential of AI – driven platforms in advancing nanomedicine development.

AI Design of Nucleic Acid Drug Delivery Systems

The success of lipid nanoparticles (LNPs) in mRNA COVID – 19 vaccines has underscored the critical role of polymer nanoparticle – based delivery systems for nucleic acid drugs, including mRNA and siRNA. However, designing these systems involves navigating challenges such as delivery efficiency, target specificity, and safety. Artificial intelligence (AI) offers innovative solutions by identifying patterns from vast datasets to predict the relationships between molecular structures and their functional outcomes.

A research team led by Lizhuang Liu from the Industrial Artificial Intelligence group at the Shanghai Advanced Research Institute, Chinese Academy of Sciences, has made significant progress in this area. They developed TransMA, a novel multimodal interpretable property prediction model that integrates the Transformer architecture with the state – space Mamba model. TransMA is designed to extract and interact with fused features from both one – dimensional and three – dimensional molecular representations of LNPs [14].

To enhance prediction accuracy for multimodal feature fusion, the team introduced an adaptive hybrid loss function that combines mean squared error (MSE) with a triplet loss. Furthermore, a molecular channel attention mechanism was implemented to model interdependencies among feature channels, evaluate atom – level attention scores, and identify key molecular substructures. This mechanism provides model interpretability, as the atoms assigned high attention scores consistently align with those known to critically influence biochemical properties.

TransMA achieves a mean squared error (MSE) of 3.64 and a coefficient of determination of 0.49. In a comprehensive benchmark against multiple graph – based convolutional neural networks and other Transformer architectures, TransMA demonstrated state – of – the – art performance across key evaluation metrics, including MSE, R^2 , and the Pearson correlation coefficient, setting a new benchmark in the field.

Prediction and Regulation of Protein Corona Composition

Upon introduction into a biological system, nanoparticles rapidly adsorb proteins, forming a «protein corona» that dictates their in vivo fate, including biodistribution, cellular uptake, and clearance rates [2]. Consequently, predicting and controlling the composition of the protein corona is critical for designing effective nanomedicines.

A random forest model (AUC=0.83) successfully correlated nanoparticle surface chemistry with the adsorption of specific proteins, revealing that the enrichment of apolipoprotein A1 can reduce macrophage – mediated clearance [17]. In a similar vein, the XGBoost algorithm has been employed to analyze how the surface features of DNA nanostructures influence the protein corona's composition. By deciphering the relationships between nanoparticle

physicochemical parameters (e.g., size, zeta potential, hydrophobicity) and protein adsorption, these machine learning models inform the rational design of long – circulating «stealth» nanoparticles.

Beyond prediction, generative AI methods like the Protein Corona Generative Adversarial Network (PC – GAN) can inversely design nanoparticle surfaces with tailored protein adsorption profiles through latent space manipulation [18]. This proactive strategy for controlling corona composition holds great promise for overcoming the unpredictable in vivo fate of nanoparticles and accelerating the clinical translation of targeted nanomedicines.

Formulation and Process Optimization of Preparations

Beyond molecular design, AI technology demonstrates significant potential in optimizing the formulation and manufacturing processes of polymer nanoparticles. The NanoForge platform, developed by Jitai Technology, has established a closed – loop workflow for the design and optimization of lipid formulations through AI – guided iterations between in silico predictions and experimental validation. Its integrated nano – delivery AI agent, ALAN, can interpret natural language or structured queries from users, thereby guiding the discovery, evaluation, and optimization of lipid – based delivery systems.

In process optimization, the integration of microfluidic technology with AI offers a novel approach for producing solid lipid nanoparticles (SLNs). Research indicates that microfluidics leverages microscale fluid dynamics to achieve rapid and uniform mixing, enabling the controlled synthesis of homogeneous nanoparticles. This method circumulates issues inherent to traditional techniques, such as inconsistent particle size and residual solvent. More importantly, the incorporation of AI and machine learning has further refined synthesis conditions, thereby enhancing reproducibility, scalability, and paving the way for industrial translation.

Technical challenges and future development

Artificial intelligence, while demonstrating significant promise in the development of polymer nanoparticles, nevertheless faces considerable challenges for its broader adoption. Key issues spanning data quality, model interpretability, clinical translation, and ethical considerations demand concerted efforts and interdisciplinary collaboration to overcome. This section will provide a systematic analysis of the primary challenges and prospective research directions for AI – driven nanomedicine.

Data Quality and Standardization

High – quality, standardized data form the cornerstone of reliable AI models. A primary obstacle to AI application in nanomedicine is severe data fragmentation. Statistics indicate that only about 5% of protein corona studies share their raw data, leading to insufficient training datasets. This issue is compounded by variations in experimental conditions across different laboratories, which complicate data standardization and ultimately undermine model generalizability and reliability.

Addressing this challenge requires building standardized databases following the FAIR principles (Findable, Accessible, Interoperable, and

Reusable). Initiatives such as the eNanoMapper database are instrumental in consolidating scattered nanotoxicology and biodistribution data. Concurrently, standardizing experimental reporting—which includes detailed records of nanoparticle physicochemical properties, experimental protocols, and biological endpoints is crucial for enhancing data quality.

For future progress, it is essential to foster a robust data – sharing culture, establish cross – institutional data alliances, and develop unified industry – wide data standards. These efforts will collectively provide a richer and higher – quality data foundation for applying AI in nanomedicine development.

Model interpretability and reliability

The application of AI in nanomedicine demands not only predictive performance but also model interpretability and reliability. When models inform preclinical decisions, a lack of biological rationale poses potential risks. In an increasingly stringent regulatory landscape, «black – box» AI decision – making is unlikely to gain approval from regulatory agencies without transparent audit trails [1].

Explainable AI (XAI) represents a key direction to address this challenge. Techniques such as attention mechanisms and feature importance analysis can reveal the basis for model decisions, thereby building researcher trust. Concurrently, embedding physical constraints into the loss function ensures predictions align with established biological principles. Another critical challenge is model generalization.

Currently, most AI models are validated only on limited datasets, and the consistency of their predictions across species and targets remains inadequate. Physics – Informed Neural Networks (PINNs) offer a solution by integrating prior knowledge into AI models, thereby enhancing extrapolation reliability. For instance, when predicting nanoparticle biodistribution, incorporating a Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) model as a constraint can significantly improve cross – species prediction accuracy [19].

Clinical Transformation and Industrialization Challenges

The clinical translation and industrialization of AI – designed polymer nanoparticles face a series of unique challenges. First, biological complexity and inter – individual variability introduce significant uncertainties when moving from in silico predictions to in vivo efficacy. Second, large – scale manufacturing and rigorous quality control impose stringent requirements on AI – guided formulation design. Finally, regulatory approval and ethical considerations present additional hurdles that must be overcome.

The integration of microfluidic technology with AI offers a promising pathway to address these industrialization challenges. Research demonstrates that microfluidics effectively resolves issues such as inconsistent particle size and residual solvents in solid lipid nanoparticle (SLN) production [20]. Meanwhile, the incorporation of AI further optimizes synthesis conditions, enhancing process reproducibility and scalability. Together, this combined strategy paves the way for the industrial – scale production of polymer nanoparticles.

Future Directions and Prospects

The application of artificial intelligence in polymer nanoparticle development is rapidly advancing, with several frontier directions emerging as particularly promising. A key future trend involves the integration of multi – omics data – genomics, proteomics, metabolomics—with nanomaterial properties to construct comprehensive models of structure – activity relationships. For instance, insights from genomics on EGFR mutations combined with proteomic profiles of overexpressed receptors can directly inform the design of targeted nanoparticles for lung cancer. Concurrently, the deep integration of automated experimental platforms with AI is paving the way for end – to – end automation of the «design – synthesis – testing – analysis» workflow [21]. Robotic scientists can autonomously synthesize nanoparticles based on AI – generated designs, perform high – throughput characterization and biological evaluation, and feed the results back to the AI models for iterative optimization, thereby establishing a closed – loop design system. This highly integrated R&D paradigm holds the potential to dramatically shorten the nanomedicine development cycle from years to mere months.

Conclusions. AI technology is catalyzing a profound transformation in the development of polymer nanoparticles for drug delivery, marking a transition from an experience – based, trial – and – error paradigm to a data – driven, precision design framework. This article has delineated the key technologies, practical progress, and central challenges of AI in the screening and application of polymer nanoparticles, underscoring the significant promise and future trajectory of this interdisciplinary convergence. Techniques such as deep learning and active learning have substantially increased development efficiency and curtailed time and expenses via big data modeling and computational simulation, yielding significant advances in drug – vector screening, nucleic acid delivery system design, and formulation optimization.

However, the deployment of AI in this domain is still in its early stages and must overcome hurdles related to data quality, model interpretability, and clinical translation. Prospective development efforts should focus on building robust, standardized databases; creating more reliable and interpretable AI models; advancing integrated dry and wet lab platforms; and formulating regulatory standards that accommodate AI – driven innovations.

As algorithms evolve and data resources expand, AI – powered pharmaceutical engineering is expected to achieve greater precision and efficiency, with applications broadening from polymer nanoparticles to the wider nanomedicine landscape. We anticipate that AI will spearhead a revolutionary change in drug delivery systems within the next decade—encompassing personalized nanomedicines and intelligent responsive carriers—thereby materializing the precision medicine ideal of «on – demand design»

REFERENCES

1. Azimi S. Intelligent nanoparticle design: unlocking the potential of AI for transformative drug delivery. *Current opinion in biomedical engineering*. 2025. P. 100625. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2025.100625>.
2. Chou W. – C. et al. Machine learning and artificial intelligence in nanomedicine.

Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology. 2025. 17(4): e70027. URL: <https://doi.org/10.1002/wnan.70027>.

3. De C.K. et al. The overlooked stereoisomers of the ionizable lipid ALC315. *Journal of the american chemical society*. 2025. 147(32). P. 28595 – 600. URL: <https://doi.org/10.1021/jacs.5c08345>.

4. Zhao Z. et al. Boosting RNA nanotherapeutics with V – ATPase activating non – inflammatory lipid nanoparticles to treat chronic lung injury. *Nature Communications*. 2025. Vol. 16, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1038/s41467-025-61688-z>.

5. Zhang H. et al. Ionizable guanidine – based lipid nanoparticle for targeted mRNA delivery and cancer immunotherapy *Science advances*. 2025. Vol. 11. no. 43. URL: <https://doi.org/10.1126/sciadv.adx5970>.

6. Zhang X. et al. Deep learning – enhanced development of innovative antioxidant liposomal drug delivery systems from natural herbs. *Mater Horiz*, 2025. 12(18). P. 7416 – 7424. URL: <https://doi.org/10.1039/D5MH00699F>.

7. Mancoo A. et al. Toward resolving heterogeneous mixtures of nanocarriers in drug delivery systems through light scattering and machine learning. *ACS nano*. 2025. 19(2). P. 2388 – 2404. URL: <https://doi.org/10.1021/acsnano.4c12963>.

8. Thakur A. et al. Quantum machine learning – based electrokinetic mining for the identification of nanoparticles and exosomes with minimal training data. *Bioactive Materials*. 2025. Vol. 51. P. 414 – 430. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2025.03.023>.

9. Gao P. et al. Molecular simulations of polymer-based drug nanocarriers: from physical and structural properties to controlled release. *Advanced healthcare materials*. 2025. e03503. URL: <https://doi.org/10.1002/adhm.202503503>.

10. Coreno – Cortés A. A., Cortés – Cuán M. A., Santamaría – Holek I. PLGA–PEG–PLGA self – aggregation study via fragment dissipative particle dynamics and quantum determined interaction parameters. *Frontiers in physics*. 2025. Vol. 13. URL: <https://doi.org/10.3389/fphy.2025.1694078>.

11. Jin S. et al. Active learning – based prediction of drug combination efficacy. *ACS nano*. 2025. 19(18). P. 17929–17940. URL: <https://doi.org/10.1021/acsnano.5c04810>.

12. Sun Y. et al. Computational design and efficacy assessment of Bufalin – Dendrimer nanoformulation for enhanced cancer therapy. *Chemical engineering journal*. 2025. Vol. 514. P. 163228. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2025.163228>.

13. Wang W. et al. Artificial intelligence – driven rational design of ionizable lipids for mRNA delivery. *Nature communications*. 2024. 15(1). P. 10804. URL: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-55072-6>.

14. Wu K. et al. TransMA: an explainable multi – modal deep learning model for predicting properties of ionizable lipid nanoparticles in mRNA delivery. *Briefings in Bioinformatics*. 2025. 26(3). URL: <https://doi.org/10.1093/bib/bbaf307>.

15. Zhang C. et al. Machine learning-driven prediction, preparation, and evaluation of functional nanomedicines via drug–drug self-assembly. *Advanced science*. 2025. 12(9). P. e2415902. URL: <https://doi.org/10.1002/advs.202415902>.

16. Almansour K., Alqahtani A. S. Utilization of machine learning approach for production of optimized PLGA nanoparticles for drug delivery applications. *Scientific reports*. 2025. 15(1). P. 8840. URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-92725-y>

17. Ban Z. et al. Machine learning predicts the functional composition of the protein corona and the cellular recognition of nanoparticles. *Proceedings of the national academy of sciences U.S.A.* 2020. Vol. 117, no. 19. P. 10492–10499. URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.1919755117>.

18. Repecka D. et al. Expanding functional protein sequence spaces using generative adversarial networks. *Nature machine intelligence*. 2021. Vol. 3, no. 4. P. 324–333. URL: <https://doi.org/10.1038/s42256-021-00310-5>.

19. Zhu J. et al. Integrating artificial intelligence and physiologically based

pharmacokinetic modeling to predict in vitro and in vivo fate of amorphous solid dispersions
Journal of controlled release. 2025. Vol. 386. P. 114123. URL:
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2025.114123>.

20. Hanari N., Mihandoost S., Rezvantalab S. Intelligence prediction of microfluidically prepared nanoparticles. *Scientific reports*. 2025. 15(1). P. 37512. URL:
<https://doi.org/10.1038/s41598-025-21471-y>.

1.2 ECOLOGICALLY ORIENTED MICROBIAL BIOTECHNOLOGIES IN THE RESTORATION OF AQUATIC ECOSYSTEMS AND SUSTAINABLE DEVELOPMENT OF AQUACULTURE AFTER HOSTILITIES

Skrotskyi S.O., Khomenko L.A., Vasyliuk O.M.

Institute of Microbiology and Virology. D.K. Zabolotny of the National
Academy of Sciences of Ukraine
skro.lbms@gmail.com

Hostilities on the territory of Ukraine have caused large – scale pollution of aquatic ecosystems with explosive compounds, fuels and lubricants, heavy metals and toxic products of the destruction of industrial infrastructure. The destruction of treatment facilities led to the ingress of a large amount of wastewater into the basins of the Dnieper, Siverskyi Donets and Southern Bug. According to the Ministry of Environmental Protection (2024), more than 2500 water bodies in Ukraine have been affected by the environmental impact of the war, which poses a serious threat to aquaculture and drinking water supply. The article systematizes modern microbial approaches to bioremediation of water bodies: biodegradation, biosorption, biostimulation and restoration of aquaculture with the help of probiotics.

Keywords: *microbial biotechnologies, bioremediation, aquaculture, probiotics, microorganisms – destructors, restoration of water bodies.*

Pollution of water bodies is one of the most pressing environmental problems of the war period. Shelling of infrastructure, destruction of sewage treatment plants and warehouses of fuel and lubricants lead to the ingress of thousands of tons of toxicants into water bodies – diesel fuel, lubricants, explosive compounds and polycyclic aromatic hydrocarbons. According to UN estimates (2023), more than 1.5 billion m³ of water in the frontline regions of Ukraine is subjected to secondary chemical stress every year. Traditional methods of purification (coagulation, neutralization, mechanical filtration) are ineffective in diffuse contamination and have a high cost [1]. Instead, microbial biotechnologies are based on the natural ability of destructive bacteria to destroy complex organic compounds [2, 3]. The combination of destructive and probiotic properties of microorganisms allows you to simultaneously neutralize toxicants and stabilize biocenosis, restoring the natural self – cleaning ability of water bodies.

The purpose of the study is to substantiate the efficiency, environmental, economic feasibility and technological prospects of the introduction of microbial biotechnologies for the rehabilitation of aquatic ecosystems affected by hostilities and ensuring the sustainable development of aquaculture in Ukraine.

Subject of research. Microbial biotechnologies (bioaugmentation, biostimulation, consortia of microorganisms) as tools for ecological cleansing, restoration of biological balance and maintenance of aquaculture productivity in post – conflict aquatic ecosystems.

Research objectives. To analyze the environmental consequences of hostilities based on specific freshwater bodies of Ukraine, in particular the types of pollution and their impact on aquaculture. To substantiate the advantages of microbiological restoration and formulate the organizational structure for the introduction of complex microbial biotechnologies as a nature – based approach to the restoration of aquatic flora and fauna.

Methods and materials

To assess microbial biotechnologies in the restoration of aquatic ecosystems affected by hostilities, comprehensive studies of natural reservoirs of the villages of Kalynivka and Petrushky, located within the Kyiv region, were carried out. The study of the state of water bodies during bioremediation activities, using the consortium of microorganisms ULTRACHIST, was carried out in the period May – October 2025. Bioremediation activities were carried out on these reservoirs using the consortium of microorganisms ULTRACHIST, which consists of microorganisms: *Dietzia maris*, *Rhodococcus erythropolis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aureofaciens*.

The probiotic activity of lactic acid bacteria that make up the biological product ULTRALACT FISH *Lactobacillus plantarum* 12d, *Latilactobacillus sakei* 7f and *Enterococcus casseliflavus* 8c was evaluated by the survival rate of fry, weight gain. At the beginning of the research, an analysis of the state of water bodies by ecological – trophic groups of microorganisms was introduced, developed by us.

Bioindication and biotesting are important components of biomonitoring of aquatic ecosystems. The indicator value of the bacterial component and its leading role in water self – purification is determined by bacterial diversity. In addition, microorganisms represent different ecological – trophic groups capable of specific use of substances of different origins. The ecological – trophic groups, the definition of which was carried out in the study, include: oligotrophic and saprophytic microorganisms, micromycetes, lactic acid bacteria, hydrocarbon and TNT – oxidizing microorganisms, coliform, nitrogen – fixing and phosphate – mobilizing microorganisms.

To measure the transparency of water, special devices are used, such as the Secchi disc. A white disc with a diameter of 30 cm, which is lowered into water. Measure the depth at which the disk becomes invisible. This depth (in meters) is a measure of transparency.

Determination of hydrochemical parameters was carried out according to the standard methodology of the Industry Standard «Water of fishery reservoirs».

To assess the economic efficiency of the use of microbial biotechnologies, a comparison of the costs of cleaning damaged water bodies using the proposed biotechnologies with other methods was used. The economic efficiency of the use of probiotic preparations was determined by comparing the costs of using probiotics compared to the costs of using antibiotic substances, determining the change in the dynamics of feed conversion when using probiotics.

Results

It has been found that the application of microbial biotechnology techniques for the treatment of contaminated water bodies alters the efficiency of recovery depending on various factors such as the type and concentration of pollutants, environmental conditions and changes in biotechnology in the use of bioremediation techniques. A change in the biobalance of the studied water bodies was found with an increase in opportunistic microorganisms, and an increase in specific microorganisms that indicate contamination of water bodies with explosives and oil products.

As a result of field studies, it was found that bioremediation methods successfully reduce the concentration of various pollutants in water bodies. Thus, in the studied reservoirs, the introduction of the ULTRACHIST consortium of microorganisms led to a significant decrease in the level of hydrocarbons, thereby minimizing the negative impact on aquatic life and ecosystems. The results obtained were confirmed by microbiological analysis of ecological – trophic groups, hydrochemical analysis (Fig. 1).

Bioremediation techniques such as bioaugmentation have been found to accelerate the rate of decomposition of specific pollutants. Thanks to the introduction of specialized microorganisms with the properties of decomposition of pollutants, the breakdown of pollutants is accelerated, which leads to the acceleration of the processes of purification and restoration of water quality.

Microbial biorecovery technologies are not only aimed at destroying specific pollutants, but also help in the overall restoration of ecosystems in contaminated water bodies. By decomposing pollutants and restoring water quality, biologies support the rebirth of aquatic flora and fauna, promoting biodiversity and restoring ecological balance.

It was found that the use of complex biotechnologies of recovery in water bodies made it possible to reduce biochemical oxygen consumption in water by 35 – 40% and restore the growth of fish populations in 30 days.

Therefore, it has been proven that microorganisms are important agents of natural self – purification of water bodies. Thanks to enzymatic systems, they are able to decompose organic pollutants into non – toxic products – water, carbon dioxide, nitrates and sulfates.

Bacteria of the genera *Dietzia maris*, *Rhodococcus erythropolis*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aureofaciens* proved to be particularly effective. They are able to break down hydrocarbons, phenolic compounds, explosive and pesticide residues, adapting to a wide range of temperatures and salinity. It has been confirmed that the choice of bioremediation method must be adapted to the specific pollutant and environmental conditions in order to maximize process efficiency [6].

The use of ULTRALACT FISH provided an increase in carp weight gain by 12%, a decrease in ammonium nitrogen by 30% and an increase in the survival rate of fry up to 93%. These results are consistent with international data on the effectiveness of probiotics in the prevention of fish bacteriosis [4].

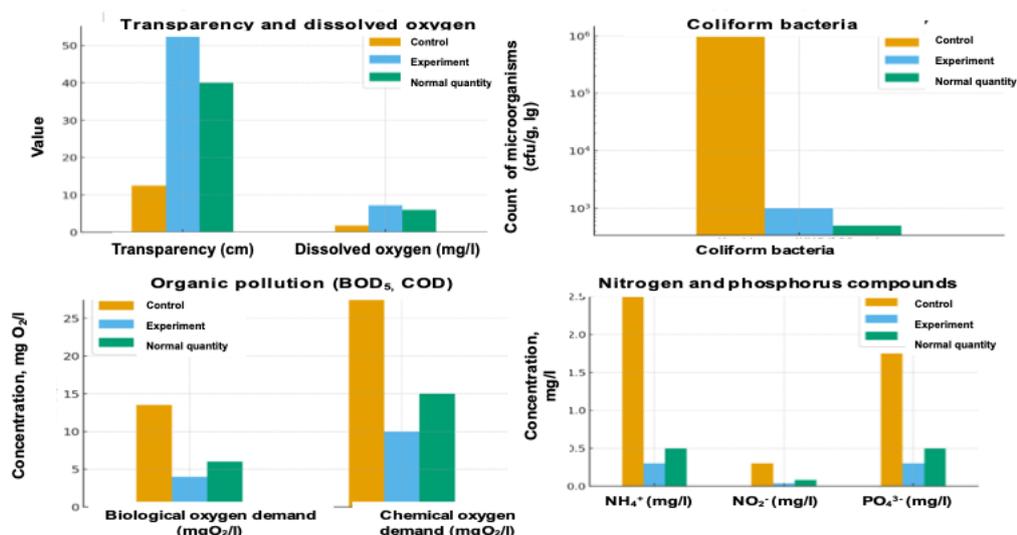


Fig.1. Results of using the consortium of microorganisms ULTRACHIST to restore a reservoir in the village of Petrushky, Kyiv region

Integration of microbial methods using a consortium of microorganisms – destructors of pollutants of the biological product ULTRACHIST and probiotic biological products of the biological product ULTRALACT FISH allows you to create a comprehensive purification system that does not generate secondary contaminants. This approach provides: reduction of BSC and COD; elimination of unpleasant odor; reduction of the concentration of organic residues; improvement of food supply for fish; restoration of trophic chains.

It has been found that biotechnological methods can reduce the cost of water treatment by 5 or more times compared to traditional approaches, which makes them available for wide implementation.

The norms of using the biological product for purification and the cost of purification of one cubic meter of water in comparison with other methods are shown. The cheapest option — For the prevention and long – term maintenance of water quality, the biological product ULTRACHIST — the cost of purification of 1 m³ will be about 0.6 – 0.9 UAH/m³. The closest cost – effective technology, which is more expensive, is coagulants, and hydrogen peroxide, which work quickly and cost less – 2 UAH/m³. But zeolite or dredging are already very expensive options (300 – 350 UAH/m³), which are used rather as capital solutions. Thus, biological products and coagulants remain the most cost – effective for regular use in fisheries. But if we take into account the complexity of action and the reliable long – term effect of the use of biological products, microbial biotechnologies have practically no competition in the long term.

Probiotics (ULTRALACT FISH) are applied with feed at a dose of 0.5 – 2 g/kg. The cost of a probiotic is \$5 – 7/kg, so the costs are only \$9 – 16 for each ton of feed. An important advantage is the absence of a maintenance period (0 days), as well as a preventive effect: a decrease (feed conversion rate FCR) by

about 12 – 14%, an increase in SGR (specific growth rate) by 15 – 20% and an improvement in water quality.

Antibiotics are used only therapeutically, during illnesses. Estimated costs of antibiotics: Florfenicol – this is \$2.5–3.75/t of fish. Oxytetracycline – costs reach \$15.4–20.1/t of fish.

Added to this are hidden costs: quarantine of 15 – 21 days, the risk of batch failure due to antibiotic residues, a possible drop in appetite and mortality during outbreaks. Conclusion: antibiotics seem cheaper «per course», but the economic benefits of probiotics are higher due to prevention, increased productivity and the absence of risks of residues and production downtime.

Therefore, microbial biotechnology methods are cost – effective and environmentally sustainable compared to traditional recovery approaches. The use of natural processes and microorganisms reduces the need for expensive equipment and energy – intensive procedures, making microbial biotechnology a viable, efficient and environmentally friendly solution for the remediation of polluted water bodies.

Based on the results of research, which proved that the synergy of microorganisms – destructors and probiotic strains of the form can comprehensively solve the problem of complex restoration of water bodies damaged by pollution, the organizational structure of the developed complex microbial biotechnology for the restoration of water bodies was formulated (Fig. 2).

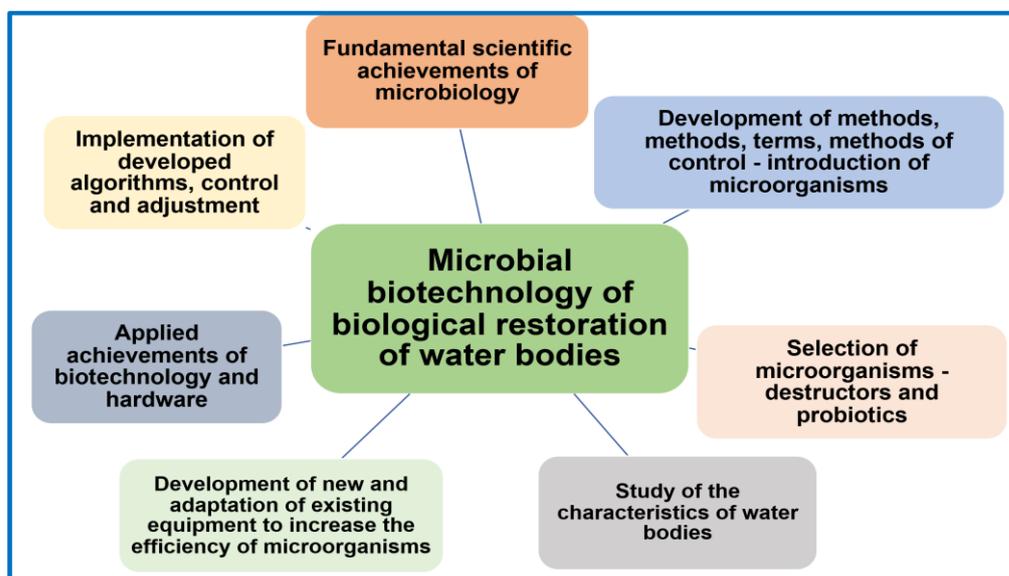


Fig. 2. Scheme of the structure of measures that make up complex microbial biotechnologies for the restoration of damaged water bodies.

The establishment of guidelines, monitoring protocols and assessment of the long – term impact of bioremediation on water quality are necessary for its widespread implementation and recognition. Current research in bioremediation aims to increase efficiency, effectiveness, and understanding of the process [7, 8]. This includes research into new microorganisms with specialized pollutant degradation capabilities, genetic engineering techniques to improve microbial performance, and the development of synergistic approaches combining

different methods for remediation of a damaged reservoir for complex pollution scenarios.

In addition, the introduction of probiotic cultures contributes not only to purification, but also to the improvement of the condition of aquatic organisms, in particular fish, by stabilizing the microbiome of the aquatic environment.

Microbial biotechnologies of winemaking comply with the principles of sustainable development, using natural processes and minimizing the use of chemical agents. They contribute to the restoration of ecosystems, not only by decomposing pollutants, but also by supporting the restoration of aquatic flora and fauna. Bioremediation methods can improve biodiversity and ecological balance, contributing to the general condition of water bodies, are promising for widespread implementation, including for the restoration of water bodies damaged by war.

Conclusions. 1. In the context of large – scale pollution of water bodies as a result of hostilities, microbial biotechnologies provide a nature – oriented, adaptive and effective solution for the rehabilitation of aquatic ecosystems in Ukraine.

2. Thanks to bioaugmentation and biostimulation, the microorganisms of the ULTRACHIST biological product are able to decompose nitroaromatic compounds, explosive residues, petroleum products and heavy metals, which are characteristic pollutants of the post – conflict environment.

3. Preparations such as ULTRALACT FISH contribute to the restoration of microbial balance, improve water quality, reduce stress levels in aquatic organisms and increase their viability, reducing the need for antibiotics.

4. They are based on natural processes, do not require complex infrastructure, minimize the use of chemicals and promote the revival of aquatic flora and fauna, which ensures a long – term ecological balance.

5. The complex use of destructor microorganisms with probiotics can reduce the cost of water treatment by 5 or more times compared to traditional approaches, and have increased economic efficiency in aquaculture production compared to antibiotics in the long term, which makes them competitive for widespread adoption.

6. Microbial recovery biotechnologies have significant prospects for inclusion in national water management strategies, taking into account regulatory support, monitoring and interdisciplinary cooperation.

Funding: This study is supported by funding from Programme project “Creating a Strategy for Assessing and Restoring War – affected Aquatic Ecosystems” No. SPS G6085 under Project Agreement No. ESC(2023)0288 (SPS MYP G6085)

REFERENCES

1. Gallego – Valero, L.; Moral – Parajes, E.; Román – Sánchez, I.M. Wastewater Treatment Costs: A Research Overview through Bibliometric Analysis. *Sustainability*. 2021, *13*, 5066. <https://doi.org/10.3390/su13095066>
2. Ogundolie, O. & Olabiyisi, S. & Adesina, Ganiyu & Jeremiah, Yetomiwa & Ogundolie, Frank. Assessment of flood vulnerability in Osun River Basin using AHP method. *BMC Environmental Science*. 1. 2024. DOI:10.1186/s44329 – 024 – 00009 – z

3. Gomes, S.D.S., da Silva, J.F., Padilha, R.M.O., de Vasconcelos, J.V.A., Negreiros Neto, L.G., Marrs, J.A., Cadena, P.G. () Behavioral Effects of the Mixture and the Single Compounds Carbendazim, Fipronil, and Sulfentrazone on Zebrafish (*Danio rerio*) Larvae. *Biomedicines*. 2024. 12.№ 6. [https://zfin.org/ZDB – PUB – 240627 – 22](https://zfin.org/ZDB-PUB-240627-22)
4. Torres – Maravilla, E., Parra, M., Maisey, K., Vargas, R. A., Cabezas – Cruz, A., Gonzalez, A., ... Bermúdez – Humarán, L. G. Importance of Probiotics in Fish Aquaculture: Towards the Identification and Design of Novel Probiotics. *Microorganisms*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). 2024. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12030626>
5. Tong Y, Huang Y, Zhang Y, Zeng X, Yan M, et al. DPP3/CDK1 contributes to the progression of colorectal cancer through regulating cell proliferation, cell apoptosis, and cell migration. *Cell Death Dis* 2021. №12. P. 529.
6. Li L, Wang J, Hou J, Wu Z, Zhuang Y, et al. Cdk1 interplays with Oct4 to repress differentiation of embryonic stem cells into trophectoderm. *FEBS Lett*. 2012. № 586. P. 4100–4107.
7. Demarco, C. F., et al. Bioremediation of aquatic environments contaminated with heavy metals: A review of mechanisms, solutions and perspectives. *Sustainability*. 2023. № 15(2), P. 1411. <https://doi.org/10.3390/su15021411>
8. Ayilara, M. S., et al. Remediation by enhanced natural attenuation; an environment – friendly remediation approach. *Frontiers in Environmental Science*. 2023. № 11, 1182586. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2023.1182586>

1.3 PROSPECTS FOR THE USE OF *PLEUROTUS OSTREATUS* EXTRACT IN TABLET FORM FOR THE PREVENTION OF ATHEROSCLEROSIS

Mykhailova K. I., Koziko N. O

Bogomolets National Medical University, Ukraine
mikhailovak26@gmail.com

*21 centuries, these are centuries of challenges, constant stress, chronic non – infectious diseases, in particular pathologies of the cardiovascular system, become the scale of the global epidemic. One of the most common and dangerous among them is atherosclerosis – a chronic disease characterized by the accumulation of lipids in the walls of the arteries, the formation of fibrous plaques, a decrease in the elasticity of blood vessels and impaired blood flow. The number of patients with atherosclerosis increases every year, which necessitates the search for effective prevention agents. One of the promising areas is the use of natural biologically active substances in the composition of the therapeutic and prophylactic, in particular with antioxidant and hypolipidemic properties. The purpose of this work was to obtain and study the technological properties of the mycelium of the fungus *Pleurotus ostreatus* (common mushrooms) as raw materials for further development of therapeutic and prophylactic with anti – atherosclerotic effect. *Pleurotus ostreatus* is a valuable source of bioactive compounds: natural antioxidants (ascorbic acid, tocopherols, phenolic compounds), β – glucans, polysaccharides, amino acids, vitamins of group B, D2, as well as minerals (selenium, Kalia, zinc). In particular, β – glucans show hypolipidemic, immunomodulatory and hypoglycemic effects, and antioxidants prevent lipid peroxidation – a key mechanism in the formation of atherosclerotic plaques. Scientific studies of recent years have confirmed that the regular inclusion of mushrooms in the diet helps to reduce the level of total cholesterol, LDL and triglycerides, and also normalizes the lipid profile. Particularly noteworthy is the ability of the mushroom to modulate the immune response and reduce systemic inflammation is another key pathogenetic factor of atherosclerosis.*

Keywords: *atherosclerosis, bioactive compounds of fungi, β – glucans, hypolipidemic effect, pleurotus ostreatus, tablets.*

Atherosclerosis is one of the most common chronic diseases of the cardiovascular system, which occupies a leading place among the causes of mortality in the world. Its pathogenesis is multifactorial and complex, develops for decades and includes sequential damage to the walls of the arteries due to impaired lipid metabolism, chronic inflammation, oxidation of lipoproteins and activation of cellular response. The first stages include the deposition of lipoproteins in the inner layer of the vascular wall (intima), migration of lymphocytes and monocytes, formation of foamy cells, activation of cytokines

and growth factors. In the later stages, the development of fibrous plaque, its calcification, microrotrombosis or complete overlap of the lumen of the vessel with a thrombus are observed. The etiological risk factors of atherosclerosis are divided into modified and unmodified. Modified include: arterial hypertension, smoking, obesity, dyslipidemia (increase in CHC, TG, LDL and reduction of HDL), diabetes, hypodynamia, malnutrition, hyperglycemia, hyperhomocysteinemia. Unmodified factors include the age over 50 – 60 years, male gender and heredity.

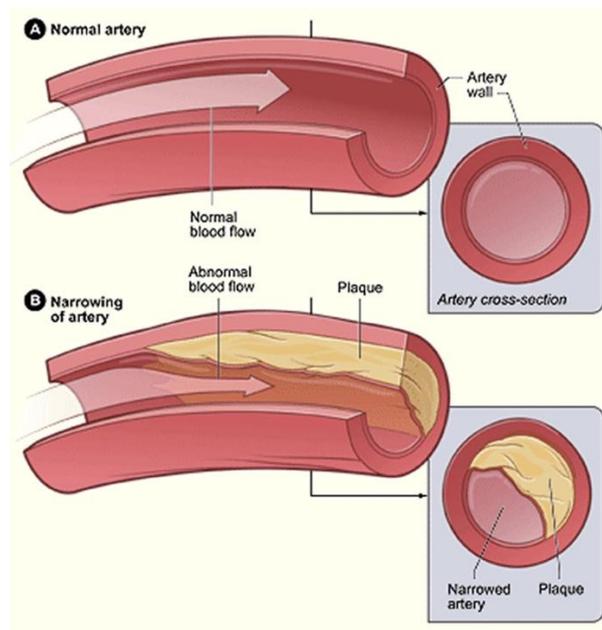


Fig.1. Morphological changes in the arterial wall during atherosclerosis compared to a normal vessel

A significant role in risk formation plays a lifestyle – it can be changed in favor of prevention due to the abandonment of bad habits, increased physical activity and rational nutrition. Modern approaches to prevention of atherosclerosis focus not only on the pharmacological correction of lipid metabolism, but also on the introduction of functional foods and dietary supplements, in particular of natural origin. Particular attention in recent years has been attracted by *Pleurotus ostreatus* (common mushroom) – an edible fungus containing a wide range of biologically active substances such as β – glucan, polysaccharides, phenolic compounds, ascorbic acid, tocopherols, vitamins B, d2, d2, and n2. Experimental and clinical studies confirm the hypolipidemic, antioxidant and immunomodulatory potential of the mushroom. Despite the known useful properties of *Pleurotus ostreatus*, its use in a standardized pharmaceutical form, in particular in the form of tablets, is an insufficiently developed direction. The tablet form has a number of advantages: accurate dosage, convenience for the patient, stability during storage, the possibility of widespread use in outpatient prevention. Given the growing prevalence of atherosclerosis, including young age groups, and the relevance of primary

prevention, the development of natural, safe and effective tools based on *Pleurotus ostreatus* is a promising area of modern pharmaceutical science.

In addition, *Pleurotus ostreatus* has good technological properties: high biomass in cultivation, stable chemical composition, ease of drying and grinding, which makes it convenient for use in the manufacture of tablets or powder forms of dosage forms.

One of the most convenient and effective dosage forms for the therapeutic and prophylactic is pills. They provide accurate dosage, convenience and long storage. The development of a tablet form of the therapeutic and prophylactic on the basis of *Pleurotus ostreatus* requires careful study of technological parameters, the choice of optimal excipients and the evaluation of the bioavailability of active components.

The purpose of the study was to substantiate and develop the composition of the tableted dosage form based on *Pleurotus ostreatus* with a hypolipidemic effect for the prevention and auxiliary therapy of atherosclerosis in persons with lipid metabolic disorders. The problem is the absence of natural remedies that would combine the efficiency, safety and ease of use in chronic dyslipidemia. The purpose is to create a dietary supplement in the form of tablets, which provides a stable dosage of bioactive components of the fungus and potential clinical efficacy. Achieving the goal is planned by studying the physico – chemical and pharmaceutical properties of the substance *Pleurotus ostreatus*, the selection of excipients, the optimization of the technological process of tablet and assessment of the hypolipidemic potential of the drug model in experimental conditions.

The object and subject of the study was the cultivation of the fungus of the genus *Pleurotus* by means of deep cultivation. The AFI therapeutic and prophylactic is the *Pleurotus ostreatus* mycelium and such help are presented on Figure 2 and 3, as microcrystalline cellulose 101, microcrystalline cellulose 102, aerosil, talc, magnesium stearate. The tablets were made by direct pressing. *Pleurotus ostreatus* dry powder was thoroughly mixed with the required amount of excipients and pressed on tablet machines. The resulting tablets have undergone physical and pharmacotechnological parameters. On electronic scales, 20 tablets were weighed and the average weight oscillation (Table 1) was calculated. The resulting tablets were checked for homogeneity of mass, abrasion and strength.

Table 1.Weight variation of tablets

| | | | | | | | | | |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Tab 1 | Tab 2 | Tab 3 | Tab 4 | Tab 5 | Tab 6 | Tab 7 | Tab 8 | Tab 9 | Tab 10 |
| 0,33 g | 0,35 g | 0,34 g | 0,36 g | 0,34 g | 0,33 g | 0,30 g | 0,32 g | 0,33 g | 0,35 g |
| Tab 11 | Tab 12 | Tab 13 | Tab 14 | Tab 15 | Tab 16 | Tab 17 | Tab 18 | Tab 19 | Tab 20 |
| 0,31 g | 0,30 g | 0,30 g | 0,32 g | 0,30 g | 0,30 g | 0,32 g | 0,31 g | 0,30 g | 0,32 g |

Results: with the help of an electron microscope determined the form of powder particles, they were anisodmetric. The fractional composition affects its

fluidity, that is, the correct operation of mixing and metering devices, as well as the quality of the final product

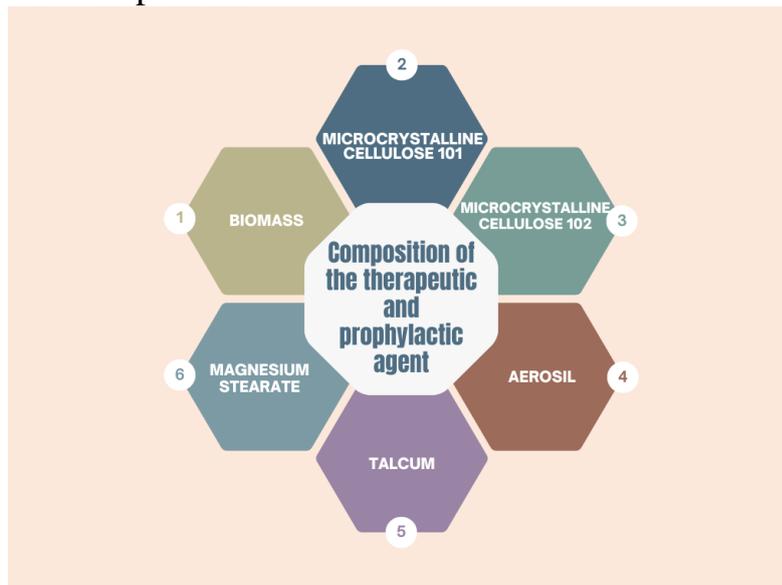


Fig. 2. Content of excipients in the therapeutic and prophylactic agent

Table 2. Content of substances in 1 tablet

| Component | Quantity (g) | Percentage (%) |
|--------------------------------|--------------|----------------|
| Biomass | 4 | 20 |
| Microcrystalline cellulose 101 | 6,6 | 33 |
| Microcrystalline cellulose 102 | 6,6 | 33 |
| Aerosil | 2 | 10 |
| Talcum | 0,6 | 3 |
| Magnesium stearate | 0,2 | 1 |

An important aspect is also the determination of the volumetric indicator such as voluminous density after shrinkage during mechanical shaking, porosity. This will show us the difference between the volume material and the volume after shrinkage. Knowing these parameters, you can predict the required amount of powdered mass. The results of the technological parameters of the fungus *P.ostreatus* are shown in the table.

Table 3. Results

| Indicator studied | The acceptable criteria | Result |
|---------------------------|-------------------------|--------|
| Average particle size, mm | 0.3 – 0.5 | 0,4 |
| Moisture content,% | 3.0 – 5.0 | 4,2 |
| Flawability, g/sec | More 4.0 | 4,2 |
| Angle of repose,deg | 25 – 35 | 29 |
| Bulk density, g/ml | 0.5 – 0.6 | 0,55 |
| Tapped density, g/ml | 0.55 – 0.65 | 0,61 |
| Porosity | 0.5 – 0.65 | 0,58 |

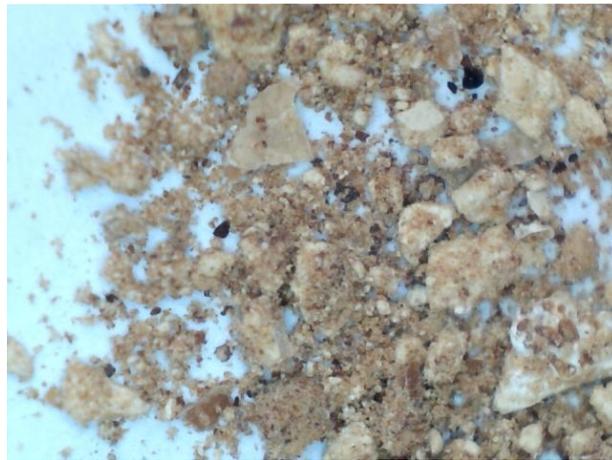


Fig. 3. Microscopy of oyster mushroom powder

The image shows that this substance has the ability to absorb moisture, so it can be classified as hygroscopic. Therefore, when developing the composition of the therapeutic and prophylactic, it is necessary to introduce such excipients as humidity regulators for better storage.

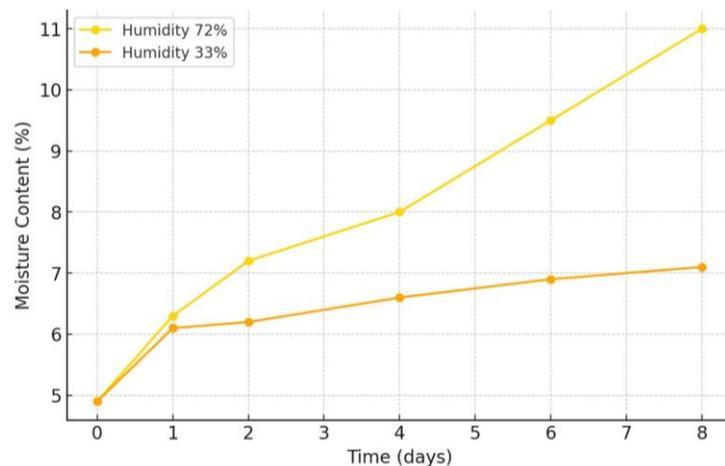


Fig.4. Change in humidity over time at different relative humidity levels

Conclusions. This study made it possible to develop the composition of tablets based on *Pleurotus ostreatus* designed for the prevention of atherosclerosis. The resulting dosage form provides the optimal bioavailability of the active components of the fungus and contributes to their gradual release, which increases the effectiveness of preventive action. Developed pills can be used as a means of reducing cholesterol and improving lipid metabolism, which is an important factor in preventing the development of atherosclerotic changes.

REFERENCES

1. The educational manual for practical classes in internal medicine for students of 5th year of medical faculties. Atherosclerosis. Ischemic heart disease. Modul 2, part 3. Zaporizhzhia: ZSMU, 2018.
2. Sanem Bulam, Nebahat şule üstün, Aysun Pekşen. Oyster Mushroom (*Pleurotus Ostreatus*) As a Healthy Ingredient for Sustainable Functional Food Production, 2022;

3. Derzhavna Farmakopeia Ukrainian. 2 vyd. T 1. State Pharmacopoeia of Ukraine. 2nd Edition. Vol. 1. Kharkiv: Derzhavne pidpriemstvo .naukovo – EKSPERTNYI FARMAKOPEOPEYNYII TSENTR. 2015.1128 p
4. Kumric M., Urlic H., Bozic J., Vilovic M., Ticinovic Kurir T., Glavas D., Miric D., Zanchi J., Bradaric – Slujo A., Lozo M., et al. Emerging Therapies for the Treatment of Atherosclerotic Cardiovascular Disease: From Bench to Bedside. *Int. J. Mol. Sci.* 2023. 24. № 9. P. 8062.
5. Stastny J., Marsik P., Tauchen J., Bozik M., Mascellani A., Havlik J., Landa P., Jablonsky I., Treml J., Herczogova P., Bleha R., Synytsya A., Kloucek P. Antioxidant and Anti – Inflammatory Activity of Five Medicinal Mushrooms of the Genus *Pleurotus*. *Antioxidants (Basel)*. 2022. 11. № 8. P. 1569.
6. González – Bonilla A., Meneses M. E., Pérez – Herrera A., Armengol – Álvarez D., Martínez – Carrera D. Dietary Supplementation with Oyster Culinary – Medicinal Mushroom, *Pleurotus ostreatus* (Agaricomycetes), Reduces Visceral Fat and Hyperlipidemia in Inhabitants of a Rural Community in Mexico. *Int. J. Med. Mushrooms*. 2022. 24. № 9. P. 49–61.
7. González – Ibáñez L., Meneses M. E., Sánchez – Tapia M., Pérez – Luna D., Torres N., Torre – Villalvazo I., Bonilla M., Petlalcaco B., Castillo I., López – Barradas A., Macías A., Tovar A. R., Martínez – Carrera D. Edible and medicinal mushrooms (**Pleurotus ostreatus*, *Ustilago maydis*, *Ganoderma lucidum*) reduce endoplasmic reticulum stress and inflammation in adipose tissue of obese Wistar rats fed with a high fat plus saccharose diet. *Food Funct.* 2023. 14. № 11. P. 5048–5061.
8. Arias – Ramos D., Chil – Núñez I., Morris – Quevedo H. J., Rojas – Vargas J. A., Beltrán – Delgado Y., Lebeque – Pérez Y., Cos P. Formulation of granules from *Pleurotus ostreatus* mushroom with potentialities for developing solid dosage forms. *Acta Pharm. Sci.* 2025. 63. № 3.
9. Libby P., Sukhova G., Lee R. T., Liao J. K. Molecular biology of atherosclerosis. *Int. J. Cardiol.* 1997. 62. Suppl. 2. P. S23–S29.
10. Roth G. A., Mensah G. A., Johnson C. O., Addolorato G., Ammirati E., Baddour L. M., Barengo N. C., Beaton A. Z., Benjamin E. J., Benziger C. P., et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990–2019: Update From the GBD 2019 Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2020. 76. P. 2982–3021.
11. Goldstein J. L., Brown M. S. A Century of Cholesterol and Coronaries: From Plaques to Genes to Statins. *Cell*. 2015. 161. P. 161–172.
12. Cannon C. P., Blazing M. A., Giugliano R. P., McCagg A., White J. A., Thérour P., Darius H., Lewis B. S., Ophuis T. O., Jukema J. W., et al. Ezetimibe Added to Statin Therapy after Acute Coronary Syndromes. *N. Engl. J. Med.* 2015. 372. P. 2387–2397.
13. Ray K. K., Landmesser U., Leiter L. A., Kallend D., Dufour R., Karakas M., Hall T., Troquay R. P., Turner T., Visseren F. L., et al. Inclisiran in Patients at High Cardiovascular Risk with Elevated LDL Cholesterol. *N. Engl. J. Med.* 2017. 376. P. 1430–1440.

1.4 ПРОТЕЇНАЗИ МОРСЬКИХ БЕЗХРЕБЕТНИХ АНТАРКТИЧНОГО РЕГІОНУ ЯК ОБ'ЄКТИ МЕДИЧНОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ

**Нікітіна Н. С., Степанова Л. І., Ракша Н. Г., Вовк Т. Б.,
Галенова Т. І., Берегова Т. В., Савчук О. М.**

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна
galenovatanya@gmail.com

Хронічні шкірні рани становлять важливу медико – соціальну проблему глобального масштабу, що охоплює мільйони людей у всьому світі. За даними узагальнених епідеміологічних досліджень, середньосвітова поширеність хронічних шкірних ран у популяції становить близько 2,21 випадку на 1000 осіб [1]. У країнах Європейського регіону ситуація залишається не менш тривожною: понад 185 мільйонів дорослих осіб щороку повідомляють принаймні про одне шкірне захворювання, включно з виразковими дефектами, пролежнями, трофічними та діабетичними виразками [2].

Особливої клінічної уваги потребують гнійно – некротичні ураження, які відзначаються затяжним перебігом, схильністю до рецидивів та високим ризиком інфікування, що значно ускладнює процес регенерації. Такі стани спричиняють суттєве соціально – економічне навантаження: пацієнти потребують тривалого догляду, частих перев'язок, антибактеріальної терапії та нерідко госпіталізації у стаціонарні відділення, що збільшує витрати системи охорони здоров'я.

Результати мультицентрових досліджень, проведених у країнах Європи, включно з Україною, підтверджують значне зниження якості життя у пацієнтів із хронічними ранами, особливо гнійно – некротичними. До головних чинників належать персистуючий біль, утруднена мобільність, ризик інфекційних ускладнень, порушення сну, соціальна ізоляція та розвиток депресивних розладів [3, 4]. Сукупна дія цих факторів не лише знижує працездатність, а й формує тривале психоемоційне навантаження, створюючи додатковий тиск на систему медичного та соціального забезпечення.

У сукупності наведені дані переконливо свідчать, що проблема хронічних ран виходить далеко за межі суто медичної площини й потребує міждисциплінарного підходу, який поєднує зусилля клініцистів, біохіміків, фармакологів і біотехнологів. Ефективне лікування таких уражень неможливе без створення нових локальних терапевтичних засобів, спрямованих на м'яке очищення ран від некротичних тканин, контроль мікробної контамінації та активацію природних механізмів регенерації.

Традиційні методи очищення ран, зокрема хірургічна некротомія, механічне видалення ушкоджених тканин, а також застосування антисептиків чи антибіотиків, хоча й залишаються загальноприйнятим стандартом лікування, мають низку суттєвих обмежень. Вони часто

супроводжуються больовими відчуттями, травматизацією грануляційної тканини, можуть спричиняти розвиток побічних ефектів і не завжди забезпечують швидке та повне загоєння.

У зв'язку з цим зростає інтерес до альтернативних, біоорієнтованих стратегій терапії, які відзначаються фізіологічністю дії та високою біосумісністю з тканинами організму. Особливе місце серед них посідає ензимна терапія – використання протеолітичних ферментів для м'якого, селективного очищення ран від некротизованих тканин, зменшення бактеріального навантаження та стимуляції проліферативних процесів, що у комплексі сприяє оптимізації природного перебігу регенерації [5].

Одним із перспективних напрямів сучасної терапії ран є використання препаратів на основі колагеназ – специфічних протеїназ, здатних каталізувати деградацію колагену, основного структурного білка позаклітинного матриксу. Препарати, до складу яких входять колагенази, довели свою високу клінічну ефективність, сприяючи скороченню часу загоєння ран, зниженню частоти ускладнень та покращенню якості життя пацієнтів [6].

Механізм дії колагенолітичних ензимів ґрунтується на їхній здатності гідролізувати триспиральну структуру фібрилярних колагенів (переважно типів I, III та V), що становлять основу позаклітинного матриксу [7]. У природних умовах нативний колаген є надзвичайно стійким до неспецифічних протеаз, таких як трипсин або хімотрипсин, проте ензими з колагенолітичною активністю, зокрема матриксні металопротеїнази (ММП) або бактеріальні колагенази, здатні каталізувати розрив пептидних зв'язків у триспиральному сегменті колагену. Завдяки селективній протеолітичній активності колагенази забезпечують м'яке та контрольоване руйнування нежиттєздатних структур позаклітинного матриксу, не пошкоджуючи життєздатних клітин, що створює оптимальні умови для грануляції, ангіогенезу та епітелізації ранової поверхні.

У процесі гідролізу компонентів міжклітинного матриксу колагенази сприяють видаленню залишків деградованих білків і клітинного детриту, що можуть інгібувати репаративні процеси, та вивільненню біологічно активних молекул, зокрема факторів росту (PDGF, TGF – β , EGF, VEGF тощо), які регулюють клітинну міграцію, проліферацію та ремоделювання тканин [8]. Це стимулює перехід рани до фази грануляції, а також активує фібробласти та кератиноцити, відповідальні за формування нових тканин і відновлення епідермального бар'єра.

Крім безпосередньої протеолітичної дії, колагенолітичні ензими чинять комплексний біологічний ефект: вони знижують локальний рівень запалення, зменшують бактеріальне навантаження, модулюють експресію цитокінів, а також підвищують чутливість клітин до факторів росту [9]. Унаслідок цього створюються умови для швидшої епітелізації та формування васкуляризованої грануляційної тканини.

Особливу роль у процесах регенерації відіграють біологічно активні пептиди, що утворюються при ензиматичному розщепленні колагену. Вони можуть виступати вторинними медіаторами міжклітинної взаємодії,

стимулюючи проліферацію фібробластів, синтез компонентів матриксу та ангиогенез [10, 11]. Такі пептиди не лише сприяють структурному відновленню тканин, а й мають імуномодулюючі та протизапальні властивості, що додатково покращує результати лікування ран різного генезу.

На різних етапах репаративного процесу ендогенні протеолітичні ензими, зокрема ММП, відіграють ключову роль у підтриманні протеолітичного балансу, руйнуванні надлишкового позаклітинного матриксу та ремоделюванні сполучної тканини [12, 13]. Порушення активності або недостатність цих ензимів є однією з головних причин уповільненого загоєння, утворення рубців і розвитку фіброзу. У таких випадках екзогенне застосування ензимів у вигляді мазей, гелів або аплікацій здатне компенсувати дефіцит ендогенних протеїназ, прискорити епітелізацію, зменшити інтенсивність запальної реакції та запобігти надмірному колагеноутворенню, що сприяє фізіологічному, безрубцевому загоєнню ран.

У сукупності ці ефекти підтверджують, що ензимна терапія із застосуванням протеїназ є науково обґрунтованою та клінічно перспективною стратегією, здатною оптимізувати перебіг репаративного процесу, скоротити період загоєння й зменшити ризик рубцювання тканин.

Попри доведену ефективність протеїназ, їхнє промислове отримання залишається складним і технологічно затратним завданням. Ензими тваринного походження характеризуються низьким виходом, значною варіабельністю активності та потребують багатоступневих процедур очищення, що істотно підвищує собівартість кінцевого продукту. Мікробні ензими, своєю чергою, часто містять домішки ендотоксинів і компонентів клітинної стінки, що обмежує можливість їх безпечного застосування у медичних цілях і вимагає додаткових етапів детоксикації та стерильного контролю.

У цьому контексті морські гідробіонти, зокрема мешканці антарктичних акваторій, розглядаються як надзвичайно перспективне джерело ензимів із унікальними фізико – хімічними характеристиками [14]. Завдяки еволюційній адаптації до екстремальних умов середовища – низьких температур, високої солоності, гідростатичного тиску та дефіциту світла – ензими цих організмів демонструють високу каталітичну активність у широкому діапазоні рН і температур, а також стійкість до іонів металів, детергентів та органічних розчинників [15]. Важливою особливістю є їхня здатність розщеплювати колаген у багатьох ділянках його поліпептидного ланцюга, що забезпечує глибше й рівномірніше гідролітичне руйнування субстрату. Це вигідно відрізняє колагенолітичні ензими гідробіонтів від їхніх тваринних і мікробних аналогів, які зазвичай каталізують гідроліз у вузько визначених ділянках триспиральної структури молекули.

Додатковою перевагою використання ензимів морського походження є їхня екологічна та економічна доцільність: отримання таких біопрепаратів можливе з вторинної морської сировини або побічних продуктів переробки гідробіонтів, що знижує виробничі витрати та сприяє

раціональному використанню біоресурсів [16]. Крім того, низький ризик контамінації патогенними мікроорганізмами та висока біосумісність ензимів гідробіонтів роблять їх перспективними кандидатами для медико – біологічних і фармацевтичних застосувань.

Все вище зазначене обумовило **мету дослідження**, а саме: розробити та експериментально обґрунтувати біотехнологічні підходи до отримання, очищення й оцінки активності колагенолітичних ензимів з гідробіонтів Антарктичного регіону (*Stereochinus neumayeri*, *Odontaster validus*, *Diplulmaris antarctica*) з метою визначення їхнього прикладного потенціалу як активних компонентів у створенні ензимних композицій для медико – біотехнологічного застосування, зокрема у складі ранозагоювальних засобів.

Об'єкт дослідження: Біотехнологічний потенціал протеолітичних ензимів гідробіонтів Антарктичного регіону як перспективного джерела біологічно активних сполук для створення функціональних препаратів медичного та фармацевтичного призначення.

Предмет дослідження: Колагенолітичні ензими, очищені з тканин морських безхребетних Антарктичного регіону, їхні структурно – функціональні характеристики, субстратна специфічність, стабільність та активність за різних умов, а також можливість їх інтеграції у біоорієнтовані композиції для стимуляції репаративних процесів у шкірі.

Методи та матеріали

Біологічні об'єкти та підготовка вихідної сировини

Як вихідний матеріал для одержання фракцій пептидів було використано біомасу гідробіонтів Антарктичного регіону – морського їжака *Stereochinus neumayeri* (13 екземплярів, загальною масою 612 г), морської зірки *Odontaster validus* (45 екземплярів, масою 812 г) та ліофілізат медузи *Diplulmaris antarctica* (120 г). Зразки біологічного матеріалу були надані Національним антарктичним науковим центром МОН України.

Відбір об'єктів здійснювали у прибережній зоні острова Галіндез (архіпелаг Аргентинських островів; географічні координати – 65°15' пд. ш., 64°15' зх. д.). На момент відбору солоність морської води становила 28,4–32,2 ‰, температура – від +1,1 до 0,8 °С.

Для приготування гомогенатів тканин заморожену масу гідробіонтів подрібнювали за допомогою електричної м'ясорубки, після чого до отриманої суспензії додавали рівний об'єм 0,05 М трис – НСІ буфера (рН 7,4), що містив 0,13 М NaCl та 0,5 % тритон X – 100. Суміш інкубували на шейкері з малою амплітудою коливань протягом 1 год при температурі +4 °С.

Після інкубації проби фільтрували через чотири шари марлі для видалення грубих часток, а потім центрифугували при 100 g протягом 30 хв при +4 °С. Отриману надосадову рідину піддавали повторному центрифугуванню при 10 000 g упродовж 30 хв. Супернатант, що містив розчинні білкові компоненти, відбирали та зберігали при –80 °С до подальшого використання у фракціонуванні та біохімічному аналізі.

Фракціонування та очищення ензимних компонентів

Після попередньої підготовки гомогенатів тканин гідробіонтів Антарктичного регіону білоквмісну сировину розморожували при температурі +4 °С та центрифугували при 10 000 g протягом 15 хв для відділення нерозчинного осаду. Отриманий супернатант – основну фракцію розчинних білків та ензимів – пропускали через мембранний фільтр із розміром пор 0,45 мкм, що дозволяло ефективно усунути дрібні забруднення та залишки клітинних структур.

З метою видалення низькомолекулярних метаболітів, солей і компонентів буфера, які могли б впливати на подальше розділення, супернатант піддавали попередньому очищенню методом хроматографії, що поділяє компоненти за розмірами, на гелі Sephadex G – 25.

Після проведення гелю – фільтрації очищені білкові розчини наносили на колонку, заповнену Q – сефарозою (Q – Sepharose Fast Flow). Цей етап дозволив розділити білкові компоненти за зарядом і виділити фракції з колагенолітичною активністю. Після нанесення проби колонку відмивали 0,01 М трис – HCl буфером (pH 9,0) до повного видалення білків, що не зв'язалися з аніонообмінником. Елюцію зв'язаних компонентів здійснювали тим самим буфером з вмістом 1 М NaCl, що забезпечувало контрольоване вивільнення білкових фракцій відповідно до сили їхньої взаємодії з носієм. Швидкість потоку під час нанесення проби та елюції становила 2 мл/хв.

Отримані білкові фракції збирали в окремі фракційні пробірки, визначали оптичну густину при 280 нм для контролю наявності білкових сполук і зберігали при температурі –80 °С до подальшого аналізу протеолітичної та колагенолітичної активності.

Ензим – електрофоретичний аналіз

Ензим – електрофоретичний аналіз (зимографія) проводився відповідно до модифікованого методу [17], який передбачає розділення білкових компонентів у поліакриламідному гелі за наявності в ньому субстратного білка.

Розділяючий гель полімеризували за присутності одного з білкових субстратів – желатину, колагену або фібриногену – у концентрації 2 мг/мл, що забезпечувало рівномірне включення субстрату в полімерну матрицю. Концентрація розділяючого гелю становила 12% при використанні желатину або фібриногену та 15% при застосуванні колагену що є необхідною умовою для сповільнення міграції заполімеризованих у розділяючий гель субстратних білків.

Електрофорез проводили у вертикальній системі при силі струму 19 мА для концентруючого гелю та 36 мА для розділяючого гелю, використовуючи стандартний трис – гліциновий буфер (pH 8,3). Після завершення електрофоретичного розділення гелі двічі промивали у 2,5% розчині тритону X – 100 протягом 1 год для видалення залишків детергенту та відновлення ензимної активності білків. Далі гелі інкубували у 50 мМ трис – HCl буфері (pH 7,4), що містив 130 мМ NaCl, протягом 12 год при

температурі +37 °С. За цих умов відбувалася ферментативна деградація субстрату в місцях локалізації активних ензимів.

Для візуалізації зон лізису гелі фарбували у 2,5 % розчині барвника Кумасі діамантовий синій (R – 250 або G – 250) у суміші етанолу та оцтової кислоти, після чого проводили знебарвлення до появи світлих ділянок протеолізу на темно – синьому фоні.

Як молекулярні маркери та стандарти активності використовували плазмін, його деградовані форми та трипсин. Отримані електрофореграми аналізували за допомогою програми TotalLab 2.01, що дозволяло оцінити інтенсивність лізису та молекулярну масу білкових фракцій, що мали виражену протеолітичну активність.

Визначення колагенолітичної активності

Колагенолітичну активність очищених ензимних фракцій визначали за швидкістю гідролізу колагену з подальшою кількісною оцінкою утворених амінокислот та пептидів за допомогою нінгідринового реактиву [18].

До 0,05 М трис – HCl буфера (рН 7,8), що містив 2 мМ CaCl₂, додавали 0,1 % колаген як субстрат та відповідну кількість досліджуваної фракції, еквівалентну 50 мкг білка. Отриману реакційну суміш інкубували у термостаті при +37 °С протягом 5 год для забезпечення ензиматичного гідролізу субстрату. Реакцію зупиняли шляхом кип'ятіння проб на водяній бані при +95 °С упродовж 5 – 7 хв, після чого зразки центрифугували при 5 000 g протягом 10 хв. Надосадову рідину (аліквоту) відбирали для подальшого аналізу.

До кожної проби додавали рівний об'єм нінгідринового реактиву (4% розчин нінгідрину у 0,1 М цитратному буфері, рН 5,0), після чого проби закривали кришками зі зворотним холодильником і нагрівали на киплячій водяній бані протягом 15 – 20 хв до розвитку характерного фіолетового забарвлення комплексу з вільними аміногрупами. Після охолодження зразків оптичну густину вимірювали при довжині хвилі 570 нм відносно контрольної проби, що не містила ензиму. Активність ферменту виражали в одиницях, розрахованих за калібрувальним графіком, побудованим для лейцину, який використовували як стандарт.

Отримані результати дозволяли кількісно оцінити інтенсивність гідролізу колагену та порівняти колагенолітичну активність окремих фракцій, виділених із різних видів гідробіонтів Антарктичного регіону.

Визначення належності ензимів до металозалежних і серинових протеїназ

Загальну протеолітичну активність ензимних фракцій визначали відповідно до методу [19] з використанням казеїну як субстрату.

Досліджувані фракції інкубували з 1 % розчином казеїну у 50 мМ трис – HCl буфері (рН 7,4) при температурі +37 °С протягом 30 хв. Після інкубації ферментативну реакцію зупиняли додаванням трихлороцтової кислоти (ТХО) до кінцевої концентрації 15 %. Отримані проби центрифугували при 10 000 g протягом 30 хв, після чого визначали

оптичну густину надосадової рідини при 280 та 320 нм відносно холостої проби, яка містила всі реакційні компоненти, окрім досліджуваного зразка.

Для оцінки внеску окремих класів протеїназ у загальну активність до реакційної суміші додавали специфічні інгібітори:

– соєвий інгібітор трипсинів (кінцева концентрація 1 мг/мл) – для блокування активності серинових протеїназ;

– етилендіамінтетраоцтову кислоту (ЕДТА) у кінцевій концентрації 10 мМ – для інгібування металозалежних ферментів.

У холості проби також вносили відповідні інгібітори для контролю фонових змін абсорбції.

Загальну протеолітичну активність розраховували за формулою:

$$K. \text{ од.} \times \text{мг}_{\text{білка}}^{-1} = E \times \frac{a}{b}, \text{ де}$$

E – різниця оптичної густини ($E_{280} - E_{320}$);

a – коефіцієнт 1,3;

b – кількість білка в пробі (мг).

Внесок металозалежних або серинових протеїназ у загальну активність виражали у відсотках відносно контрольного значення.

Концентрацію білка в досліджуваних зразках визначали за методом Бредфорда [20] із використанням сироваткового альбуміну як стандарту.

Для підтвердження присутності серинових протеїназ у фракціях додатково застосовували синтетичний хромогенний субстрат $N\alpha$ – benzoyl – L – Arg – pNA (BArNA) у кінцевій концентрації 0,3 мМ. Реакційну суміш інкубували при +37 °С, вимірюючи оптичну густину при 405 нм через кожні 5 хв протягом 30 хв.

Ферментативну активність розраховували за формулою:

$$\text{мкмоль пНА} \times \text{мг}_{\text{білка}}^{-1} = \frac{\Delta E}{10,6 \times a \times \Delta t} \times 1000, \text{ де}$$

ΔE – різниця оптичної густини проби, виміряна на 30 – й і 1 – й хвилини інкубації;

$\Delta t = 29$ (30 хв – 1 хв);

10,6 – коефіцієнт мілімолярної екстинкції для пара – нітроаніліну (пНА);

a – кількість білка в пробі (мг).

Отримані результати дозволяли кількісно оцінити загальну протеолітичну активність фракцій і визначити співвідношення між сериновими та металозалежними протеїназами, що характеризують специфічність ензимного комплексу гідробіонтів Антарктичного регіону.

Оцінка фібринолітичної активності фракцій

Фібринолітичну активність досліджуваних ензимних фракцій визначали за здатністю розчиняти сформований фібриновий згусток.

Полімеризацію фібриногену у фібриновий згусток ініціювали додаванням тромбіну у кінцевій концентрації 0,2 МО до розчину

фібриногену (2 мг/мл) або до зразків плазми крові. Суміш інкубували у термостаті при +37 °С до утворення щільного фібринового згустку; тривалість процесу полімеризації становила 15–20 хв.

Після формування згустку на його поверхню обережно нашаровували досліджувані фракції протеолітичних ензимів у кількості, що відповідала 20 мкг білка, та рівний об'єм 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,0).

У контрольних пробах на поверхню згустку наносили тільки фосфатний буфер у відповідному об'ємі. Усі пробірки щільно закривали кришками та інкубували у термостаті при +37 °С протягом 12 год.

Після завершення інкубації проводили візуальну оцінку ступеня лізису фібринового згустку, порівнюючи зміни у дослідних і контрольних пробах. Наявність часткового або повного розчинення згустку свідчила про фібринолітичну активність досліджуваних ензимних фракцій.

Визначення оптимальних умов дії протеолітичних ензимів

Визначення рН – оптимуму активності. Оптимальні значення рН для ферментів, присутніх в очищених ензимних фракціях, визначали у діапазоні рН від 2,2 до 10,6 із використанням серії буферних систем:

- 0,1 М гліцин – НСІ буфер (рН 2,2 та 3,2);
- 0,1 М фосфатний буфер (рН 6,0, 7,0 та 8,0);
- 0,1 М гліцин – NaOH буфер (рН 9,0, 10,0 та 10,6).

Як субстрат застосовували хромогенний пептид Н – D – Val – Leu – Lys – рНА у кінцевій концентрації 0,3 мМ. Реакційні суміші інкубували при +37 °С, після чого оптичну густина вимірювали при довжині хвилі 405 нм через кожні 5 хв упродовж 30 хв [21].

Ферментативну активність у кожному значенні рН розраховували за формулою, наведеною у підрозділі «Визначення належності ензимів до металозалежних і серинових протеїназ», на основі швидкості утворення пара – нітроаніліну (рНА). Оптимум активності визначали за максимальним значенням швидкості реакції в обраній серії буферів.

Визначення температурного оптимуму. Температурну залежність активності протеолітичних ензимів оцінювали у діапазоні температур від +4 °С до +65 °С. Для цього застосовували метод визначення загальної протеолітичної активності, описаний у підрозділі «Визначення належності ензимів до металозалежних і серинових протеїназ», використовуючи казеїн (1 %) як субстрат.

Інкубацію реакційних сумішей проводили за стандартних умов (рН 7,4) при різних температурах із подальшим вимірюванням оптичної густини надосадової рідини при 280 нм. За отриманими даними будували температурний профіль активності, що дозволило визначити температуру оптимальної дії ензимів, а також оцінити їхню термостабільність.

Оцінка стабільності протеолітичних ензимів у лужному середовищі

Для дослідження стабільності ензимів за підвищених значень рН фракції очищених протеолітичних ферментів інкубували у 0,1 М гліцин –

NaOH буфері з рН 9,0; 10,0 та 11,0 протягом 3 год при кімнатній температурі ($\approx 22 - 25$ °C).

Після завершення інкубації до кожної проби додавали хромогенний субстрат Н – D – Val – Leu – Lys – pNA у кінцевій концентрації 0,3 мМ, після чого розпочинали вимірювання оптичної густини при довжині хвилі 405 нм. Вимірювання проводили починаючи з 1 – ї хвилини реакції та далі через кожні 5 хв упродовж 30 хв.

Отримані значення використовували для побудови кінетичних кривих активності та визначення відсотка збереження ферментативної активності після дії лужного середовища. Ці дані дозволяли оцінити стійкість ензимів гідробіонтів до деактивації при високих значеннях рН, що є важливим показником їхнього біотехнологічного потенціалу для застосування у складі фармацевтичних і медичних композицій.

Оцінка ранозагоювального поткнціалу композиції на основі ферментів з гідробіонтів на моделі гнійно – некротичних ран у щурів

Усі маніпуляції з лабораторними тваринами проводили відповідно до положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986 р.), етичних принципів, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (Київ, 2001 р.), а також чинного законодавства України та нормативно – правових актів щодо поводження з експериментальними тваринами. Проведення дослідження було схвалено Комітетом з біоетики наукових досліджень Київського національного університету імені Тараса Шевченка, протокол №4 від 30 липня 2024 року.

У дослідженні використовували нелінійних статевозрілих самців білих щурів масою 200 – 250 г. Загальна кількість тварин становила 16 особин, які були рівномірно розподілені на контрольну та дослідну групи. Перед початком дослідження тварини пройшли 7 – денну акліматизацію в умовах карантину, після чого оцінювали їх загальний стан і проводили контрольне зважування.

Інвазивні маніпуляції виконували під загальним знеболенням: щурам вводили внутрішньоочередно ксилазин гідрохлорид («Ксила», Interchemie, Нідерланди) у дозі 20 мг/кг. Протягом експерименту тварин утримували групами по чотири особини в стандартних умовах, із вільним доступом до води та їжі *ad libitum*, за сталої температури (22 ± 3 °C), відносної вологості (60 ± 5 %) та природного світлового режиму.

Модель гнійно – некротичного ураження шкіри відтворювали шляхом підшкірного введення 0,1 мл 10% – го розчину хлориду кальцію (CaCl_2) у паравертебральну ділянку спини [22]. Такий підхід забезпечував локальне ушкодження тканин із розвитком асептичного некрозу, подібного за перебігом до гнійно – некротичних ран у клінічних умовах. Площа ураження не перевищувала 400 мм^2 , що дозволяло стандартизувати розмір ранової поверхні для подальших порівняльних досліджень.

На 4 – 5 – ту добу після індукції некрозу проводили хірургічну некротомію утвореного струпа, після чого одразу розпочинали місцеве лікування, яке тривало до моменту повної епітелізації рани.

У дослідженні застосовували ензимну композицію, розроблену на основі 0,6 % карбополу (Carbopol 980, “Lubrizon”, Бельгія), до якої додавали очищені фракції протеїназ, ізольованих із тканин морського їжака *Sterechinus neumayeri* та морської зірки *Odontaster validus*. Отриманий гель наносили місцево на ранову поверхню один раз на добу протягом усього періоду лікування.

Тварини контрольної групи лікування не отримували.

Основним показником оцінки ранозагоювальної дії ензимної композиції була площа рани (мм²), яку вимірювали у динаміці на 0, 3, 6, 9, 12, 18, 21, 24, 27 та 30 – ту добу лікування. Для цього до ранової поверхні прикладали прозорий трафарет із нанесеною міліметровою сіткою, що дозволяло об'єктивно визначити площу ураження. Спостереження за тваринами проводили до повної епітелізації та рубцювання рани.

Статистична обробка результатів

Статистичну обробку експериментальних даних проводили із застосуванням методів варіаційної статистики за допомогою програмних пакетів OriginLab Origin® Pro 9.1 та StatSoft Statistica® 10.

Для кожного показника обчислювали середнє арифметичне значення (M) та середню квадратичну помилку середнього (m). Перевірку нормальності розподілу вибірок здійснювали за критерієм Шапіро – Уїлка. У випадках, коли розподіл відповідав нормальному, достовірність відмінностей між групами оцінювали за допомогою параметричного критерію Стьюдента (t). При відхиленні розподілу від нормального застосовували непараметричний критерій Манна – Уїтні (U). Різницю між показниками вважали статистично достовірною при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Оцінка ензимного профілю морських організмів Антарктики з позицій сучасної біотехнології: фракціонування та загальна характеристика

На сучасному етапі розвитку науково – технологічного прогресу пошук нових природних джерел біологічно активних речовин для потреб промисловості, медицини та наукових досліджень набуває особливої актуальності. Проблема забезпечення стабільної сировинної бази пов'язана не лише зі зростаючим дефіцитом традиційних джерел, а й зі зміною підходів до біотехнологічного виробництва, що орієнтується на екологічну безпечність, біосумісність і відновлюваність природних ресурсів.

У цьому контексті значну увагу привертають ензимні препарати природного походження, зокрема на основі протеїназ, які мають широкий спектр застосування – від харчової та шкіряної промисловості до медицини та фармації. Серед них особливе місце займають колагенолітичні ензими (колагенази), здатні розщеплювати волокна колагену – основного

структурного білка позаклітинного матриксу, що забезпечує міцність і еластичність тканин.

Орієнтація даного дослідження на пошук та характеристику колагенолітичних ензимів обумовлена їхнім високим біотехнологічним потенціалом для застосування у різних секторах промисловості та медицині [14]. Завдяки своїй здатності вибірково руйнувати колагенові фібрили, ці ензими широко використовуються у шкіряній і хутряній промисловості, де вони сприяють м'якому видаленню неколагенових білків і покращують якість обробки шкірної сировини. У харчовій промисловості колагенази відіграють все більш вагомую роль, зокрема в таких технологічних процесах, як розм'якшення м'ясної сировини [23, 24]. Колагенази також широко застосовуються для переробки відходів харчової промисловості з метою отримання біоактивних пептидів, білкових гідролізатів із високою біологічною активністю, які можуть бути використані як інгредієнти у функціональних харчових продуктах і напоях, що відповідає сучасним концепціям циркулярної біоекономіки.

У біомедицині та фармації колагенолітичні ензими використовують для ензимного очищення ран, лікування опіків, хронічних виразок, рубців і контрактур [25]. Колагенази є також складовими фармацевтичних препаратів для регенерації тканин і біокосметичних засобів, що стимулюють неоколагенез і підвищують еластичність шкіри.

Крім того, у біотехнології та тканинній інженерії колагенази використовуються для отримання клітинних суспензій із тканин (ізолюваних клітин печінки, підшлункової залози, фібробластів, хондроцитів), а також у створенні колагенових гідрогелів, біоматеріалів і систем контролюваного вивільнення лікарських речовин.

Колагенолітичні ензими були виділені та охарактеризовані з різних джерел [14]. Найбільш вивченими є мікробні колагенази, отримані з *Clostridium histolyticum* та *Bacillus subtilis*, які сьогодні становлять основу більшості комерційних препаратів [26, 27]. Крім того, джерелом ензимів є тканини тваринного походження (свиней, великої рогатої худоби), а також відходи рибної промисловості – шкіра, луска, сполучнотканинні залишки [28, 29]. До так званих «несправжніх» колагеназ належать рослинні ферменти – папаїн (з папаї) та бромелайн (з ананаса), які не мають істинної колагенолітичної специфічності, але широко застосовуються у косметології та медицині завдяки здатності частково гідролізувати білки колагенового типу [30, 31].

Серед потенційних джерел нових колагенолітичних ензимів особливу увагу привертають морські гідробіоти, які завдяки адаптації до екстремальних умов морського середовища (низькі температури, висока солоність, тиск, дефіцит світла) продукують білки з унікальними фізико – хімічними властивостями. Ензими, ізолювані з морських організмів, часто характеризуються високою активністю в широкому діапазоні рН, термолабільністю, стійкістю до солей і органічних розчинників, а також високою субстратною специфічністю щодо колагенів типів I, II та III [32,

33]. Такі властивості роблять їх особливо перспективними для біомедичних і фармацевтичних застосувань.

Крім біохімічних переваг, морські гідробіонти мають низку економічних і технологічних переваг: можливість утилізації вторинної сировини (відходів морепродуктів); зниження собівартості отримання цільових молекул у порівнянні з ферментами тваринного походження; низький ризик мікробної контамінації патогенами, притаманними наземним організмам; висока біосумісність продуктів ферментативної обробки для медичного використання.

Таким чином, зростаючий попит на препарати білкової природи, складнощі, пов'язані з використанням традиційних джерел сировини, а також відсутність системних досліджень щодо біохімічних властивостей ензимів морського походження, особливо з організмів Антарктичного регіону, зумовлюють актуальність та перспективність вивчення цього напрямку.

У зв'язку з цим першим завданням дослідження було оцінити можливість використання гідробіонтів Антарктичного регіону – медузи *Diplulmaris antarctica*, морського їжака *Sterechinus neumayeri* та морської зірки *Odontaster validus* – як потенційних джерел колагенолітичних ензимів. Метою первинного скринінгу було виявлення видів із найвищою протеолітичною активністю та визначення придатності їхніх білкових фракцій для подальших біохімічних і біотехнологічних досліджень.

На початковому етапі дослідження, з метою оцінки наявності у гомогенатах тканин досліджуваних гідробіонтів ензимів, здатних розщеплювати колаген, було проведено ензим – електрофоретичний аналіз у поліакриламідному гелі, полімеризованому за присутності колагену як субстрату.

Як видно з рис. 1, усі досліджувані зразки містили високоактивні протеолітичні ензими, про що свідчать чітко виражені зони гідролізу у площині гелю.

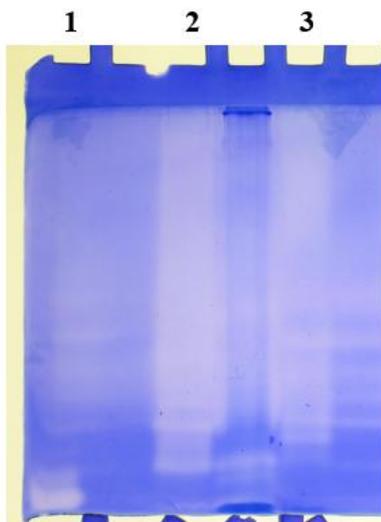


Рис. 1. Ензим – електрофореграма (субстратний білок колаген) гомогенатів тканин гідробіонтів Антарктичного регіону: 1 – *Diplulmaris antarctica*; 2 – *Odontaster validus*; 3 – *Sterechinus neumayeri*

Високий ступінь розщеплення субстратного білка не дозволив достовірно оцінити молекулярну масу активних компонентів, тому на наступному етапі проби було розведено у 100 разів для отримання більш диференційованої картини ферментативної активності.

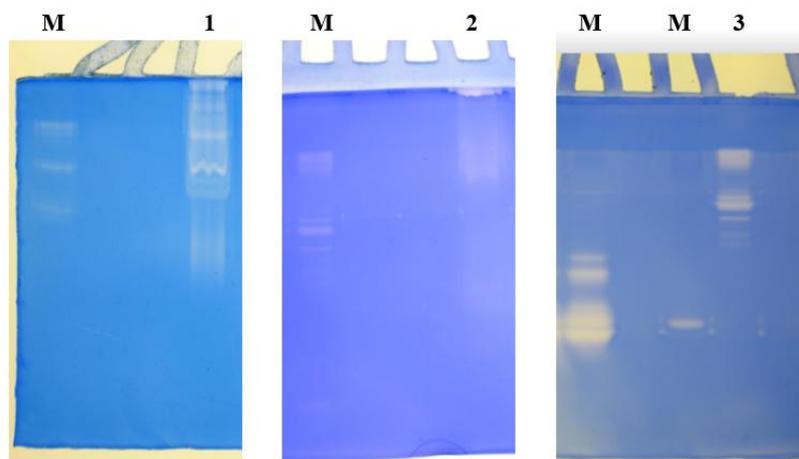


Рис. 2. Ензим – електрофореграма (субстратний білок колаген) гомогенатів тканин гідробіонтів Антарктичного регіону за розведення проб у 100 раз:
1 – *Odontaster validus*; 2 – *Diplulmaris antarctica*; 3 – *Sterechinus neumayeri*

Як показано на рис. 2, ферменти, присутні у гомогенатах тканин гідробіонтів Антарктичного регіону, належать переважно до високомолекулярних білків. Разом з тим, незначна активність візуалізується і в ділянці, що відповідає білкам з молекулярною масою близько або нижче 30 кДа, що може свідчити про наявність у зразках декількох протеїназ із різними фізико – хімічними характеристиками.

Отже, первинний аналіз досліджуваних зразків на наявність ензимів, здатних розщеплювати колаген, показав, що у тканинах гідробіонтів *Odontaster validus*, *Diplulmaris antarctica* та *Sterechinus neumayeri* дійсно присутні колагенолітичні ферменти. Цей результат став підставою для подальшого етапу роботи – одержання фракцій, збагачених на колагенолітичні ензими.

Відомо, що методичні підходи до виділення протеолітичних ензимів є досить різноманітними і можуть поєднувати кілька послідовних стадій – осадження, гель – фільтрацію, афінну та іонообмінну хроматографію. Проте кожен додатковий етап очищення супроводжується втратою частини білкового матеріалу. Оскільки метою нашого дослідження було не повне виділення індивідуального ферменту, а отримання фракції, збагаченої на цільовий ензим, було обрано скорочений одностадійний підхід із використанням іонообмінної хроматографії на носії Q – сефароза.

Q – сефароза належить до аніонообмінників і забезпечує ефективне розділення білкових компонентів за величиною їхнього негативного заряду при фізіологічному рН. Вибір саме цього методичного підходу ґрунтувався на попередніх дослідженнях нашої наукової групи, у яких було визначено

оптимальні умови для очищення цільових білків із нетрадиційних джерел біосировини.

На рис. 3, 4 та 5 наведено хроматограми очищення фракцій протеолітичних ензимів, одержаних із тканин *Diplulmaris antarctica*, *Sterechinus neumayeri* та *Odontaster validus*. Як видно з графіків, другий пік на кожній із хроматограм відповідає фракції, що потенційно містить цільові ферменти. Висота цього піку відрізнялася для різних видів гідробіонтів, що, за умов уніфікованої процедури приготування гомогенатів та однакової маси вихідної сировини, може слугувати опосередкованим свідченням різної концентрації білкових компонентів у досліджуваних фракціях.

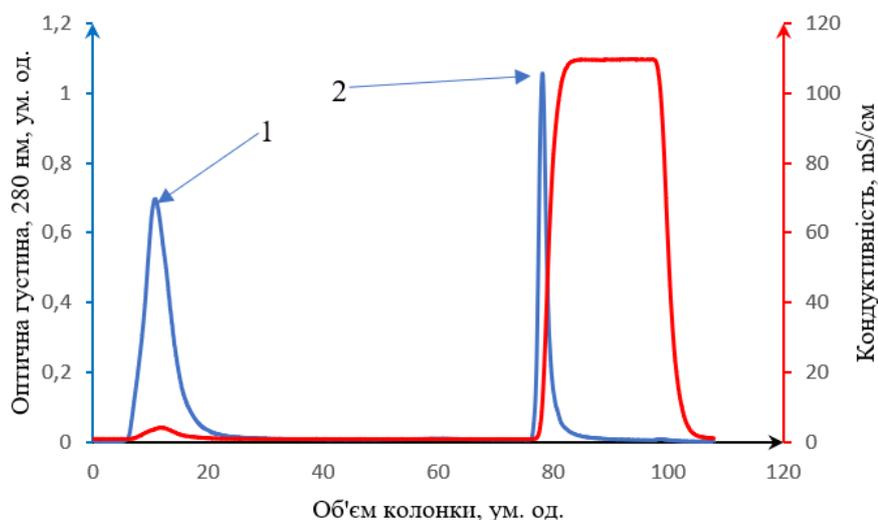


Рис. 3. Хроматограма очищення фракції протеолітичних ферментів з гомогенату тканин гідробіонту *Odontaster validus* методом іонообмінної хроматографії на Q – сефарозі: 1 – пік, що відповідає матеріалу, який не зв'язався з носієм; 2 – пік, що відповідає фракції, що містить протеолітичні ферменти

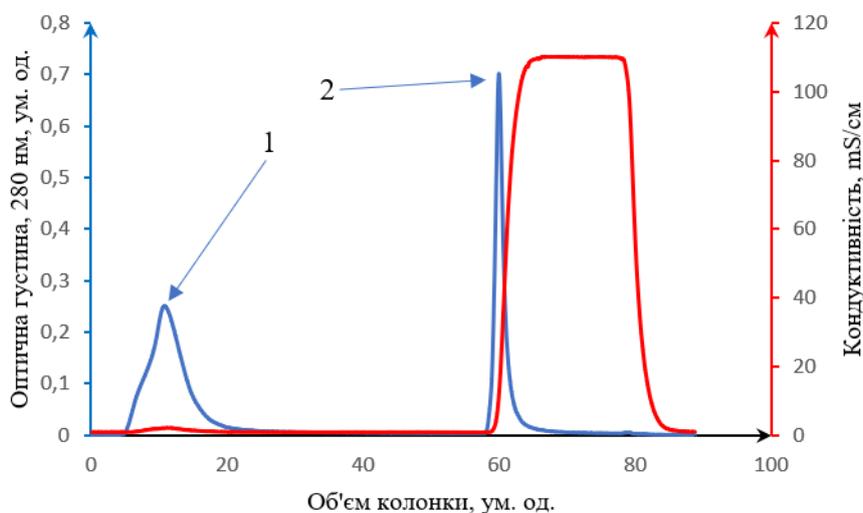


Рис. 4. Хроматограма очищення фракції протеолітичних ферментів з гомогенату тканин гідробіонту *Sterechinus neumayeri* методом іонообмінної хроматографії на Q – сефарозі: 1 – пік, що відповідає матеріалу, який не зв'язався з носієм; 2 – пік, що відповідає фракції, що містить протеолітичні ферменти

Найвищий пік елюції, що відповідає оптичній щільності 1,1 умовних одиниць, було зареєстровано для фракції, очищеної з гомогенату морської зірки *Odontaster validus* (рис. 3). Для фракції, отриманої з гомогенату морського їжака *Sterechinus neumayeri*, показник оптичної щільності становив 0,7 умовних одиниць (рис. 4), тоді як найнижче значення – спостерігалось у фракції, виділеній із гомогенату медузи *Diplulmaris antarctica* (рис. 5).

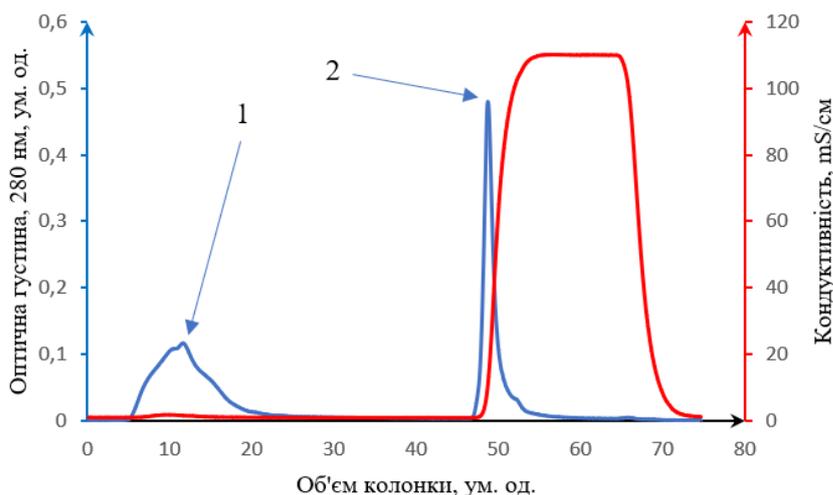


Рис. 5. Хроматограма очищення фракції протеолітичних ферментів з гомогенату тканин гідробіонту *Diplulmaris antarctica* методом іонообмінної хроматографії на Q – сефарозі: 1 – пік, що відповідає матеріалу, який не зв’язався з носієм; 2 – пік, що відповідає фракції, що містить протеолітичні ферменти

Визначення вмісту білка за методом Бредфорда узгоджується з отриманими хроматографічними профілями та підтверджує наше припущення щодо суттєво нижчої концентрації білка у фракції, виділеній з гомогенату *Diplulmaris antarctica*. Так, вміст білка у фракції, очищеної з гомогенату *Odontaster validus*, становив 1,25 мг/мл, тоді як у фракції з *Sterechinus neumayeri* – 0,75 мг/мл, а у фракції з *Diplulmaris antarctica* – лише 0,068 мг/мл.

Отже, отримані результати свідчать про нижчу перспективність використання гідробіонту *Diplulmaris antarctica* як потенційного джерела колагенолітичних ферментів, оскільки це вимагатиме залучення значно більшої кількості біосировини порівняно з використанням тканин *Sterechinus neumayeri* та *Odontaster validus*. Водночас ми не виключаємо можливості застосування цього виду у подальших дослідженнях, зокрема для отримання інших біологічно активних сполук.

Варто зазначити, що навіть за низької концентрації загального білка (а отже, і нижчого вмісту цільових ензимів) специфічна активність ферментів може залишатися високою. З огляду на це, наступним етапом дослідження було проведено кількісне визначення колагенолітичної активності в отриманих фракціях (табл. 1).

Як видно з наведених даних, загальна протеолітична активність, оцінена за здатністю гідролізувати казеїн, була найвищою у фракції, очищеній із тканин *Odontaster validus*. У фракції, одержаній із *Sterechinus neumayeri*, цей показник був найнижчим і становив $4,32 \pm 0,20$ К.од./мг білка. Водночас колагенолітична активність у фракції, отриманій з *Diplulmaris antarctica*, була у 1,75 раза нижчою, ніж у фракціях, очищених із *Odontaster validus* та *Sterechinus neumayeri*.

Таблиця 1. Загальна протеолітична та колагенолітична активність у фракціях ферментів, очищених з гомогенатів тканин гідробіонтів Антарктичного регіону ($M \pm m$, $n=6$)

| Гідробіонт | Загальна протеолітична активність, К.од./мг білка | Колагенолітична активність, Ум.од./мг білка |
|-------------------------------|---|---|
| <i>Odontaster validus</i> | $12,50 \pm 0,52$ | $14,2 \pm 0,65$ |
| <i>Sterechinus neumayeri</i> | $4,32 \pm 0,20$ | $14,6 \pm 0,57$ |
| <i>Diplulmaris antarctica</i> | $10,4 \pm 1,2$ | $8,7 \pm 0,36$ |

Таким чином, на підставі отриманих результатів для подальших біохімічних і біотехнологічних досліджень було обрано фракції, очищені з гідробіонтів *Odontaster validus* та *Sterechinus neumayeri*, тоді як *Diplulmaris antarctica* не може розглядатися як економічно доцільне джерело колагенолітичних ферментів. Разом із тим, з огляду на сучасні літературні дані, медузи залишаються перспективною сировиною для одержання колагену, який нині широко використовується у біомедичних, косметологічних та фармацевтичних розробках.

Для оцінки присутності у очищених фракціях функціонально активних протеолітичних ферментів проведено ензим – електрофоретичний аналіз із використанням різних субстратних білків. Застосування у складі поліакриламідного гелю желатину, колагену та фібриногену як субстратів дало змогу отримати початкові дані щодо субстратної специфічності ензимів, присутніх у фракціях, адже відомо, що не всі ферменти однаково ефективно гідролізують різні білки, зокрема фібриноген, який є структурно складнішим і менш доступним для дії більшості протеїназ.

Результати ензим – електрофорезу з желатином, заполімеризованим у розділюючий гель (рис. 6А), засвідчили наявність функціонально активних ферментів у фракціях, елюйованих із хроматографічного носія, тоді як у «незв'язаній» фракції спостерігалася лише слідна активність щодо цього субстрату. Такий результат підтверджує ефективність використаного підходу очищення протеолітичних ензимів із *Sterechinus neumayeri*. На гелі чітко візуалізуються зони гідролізу желатину, що відображають активність кількох ензимів різної молекулярної маси. Це свідчить про гетерогенність білкового складу фракції та можливу наявність у ній ферментів різних класів, зокрема серинових і металозалежних протеїназ.

Аналіз фракцій, очищених із *Odontaster validus* (рис. 6Б), продемонстрував наявність високоактивних протеїназ, що характеризуються дещо іншим спектром молекулярних мас. Найвищу активність виявлено у ферментів із молекулярною масою приблизно 30 – 65 кДа, однак додатково спостерігалось кілька слабо виражених смуг нижче 20 кДа, що є цікавим і потенційно важливим результатом, який може свідчити про наявність низькомолекулярних ензимів зі специфічною активністю. Подальше доочищення цих фракцій та їх біохімічна характеристизація є доцільними для з'ясування властивостей та потенційної біотехнологічної цінності таких ензимів.

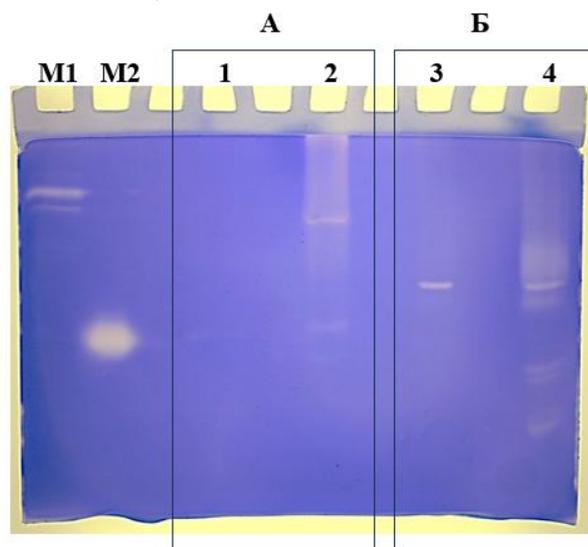


Рис. 6. Ензим – електрофореграма (субстратний білок желатин) фракцій протеолітичних ферментів з гідробіонтів Антарктичного регіону: M1 – плазмін (84 кДа); M2 – трипсин (23 кДа); А – аналіз фракції протеолітичних ферментів, очищених з гомогенату *Stereichinus neumayeri*: 1 – фракція, що не зв'язалась з Q – сефарозою; 2 – фракція, що зв'язалась з Q – сефарозою; Б – аналіз фракції протеолітичних ферментів, очищених з гомогенату *Odontaster validus*: 3 – фракція, осаджена при додаванні насиченого розчину сульфату амонію; 4 – фракція, що зв'язалась з Q – сефарозою

Вивчення молекулярної маси колагенолітичних ензимів має важливе значення для розуміння їхньої структури, функціональної специфічності та біотехнологічного потенціалу. Згідно з сучасними даними, молекулярна маса колагеназ значною мірою варіює залежно від класу ферментів, їхньої природи та джерела походження. Найпоширенішими серед природних колагеназ є ферменти, що належать до двох основних родин – металозалежні матриксні металопротеїнази (ММП) та серинові протеїнази [34].

Металопротеїнази характеризуються наявністю іонів металів (переважно Zn^{2+}) у активному центрі та мають молекулярну масу, що коливається у межах 40 – 120 кДа. На відміну від них, серинові протеїнази, активний центр яких містить залишок серину, є більш компактними за розмірами, з типовим діапазоном молекулярної маси 25 – 45 кДа, як це показано у дослідженні структури інгібіторів серинових протеїназ [35].

У деяких випадках виявляються значні відхилення від типових меж. Наприклад, Park і співавт. (2002) описали колагеназу, виділену з тканин

скумбрії (*Scomber japonicus*), з молекулярною масою 14,8 кДа [36], що є однією з найнижчих серед відомих природних протеїназ і свідчить про унікальні адаптивні властивості морських ферментів до умов середовища. І навпаки, Birkedal – Hansen і співавт. (1976) у своєму класичному дослідженні з альвеолярними макрофагами кролика зафіксували існування полімерних форм колагенази з молекулярною масою від 45 до 165 кДа, що змінювались залежно від умов середовища – ймовірно, внаслідок оборотної полімеризації білкових субодиниць [37].

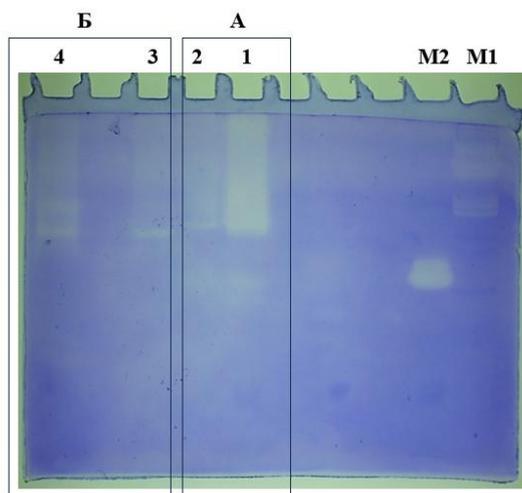


Рис. 7. Ензим – електрофореграма (субстратний білок колаген) фракцій протеолітичних ферментів з гідробіонтів Антарктичного регіону: М1 – плазмін (84 кДа); М2 – трипсин (23 кДа); А – аналіз фракції протеолітичних ферментів, очищених з гомогенату *Sterechinus neumayeri*: 1 – фракція, що зв’язалась з Q – сефарозою; 2 – фракція, що не зв’язалась з Q – сефарозою; Б – аналіз фракції протеолітичних ферментів, очищених з гомогенату *Odontaster validus*: 3 – фракція, осаджена при додаванні насиченого розчину сульфату амонію; 4 – фракція, що зв’язалась з Q – сефарозою

Таким чином, сучасні дослідження підтверджують, що молекулярна маса колагенолітичних ферментів не є сталою характеристикою, а залежить від низки факторів: джерела біосинтезу, належності до певного ферментативного класу, наявності посттрансляційних модифікацій і здатності до формування олігомерних комплексів. Це потрібно враховувати при створенні біопрепаратів, їхньому очищенні та клінічному застосуванні, оскільки структура ферменту тісно пов’язана з його біологічною активністю, специфічністю до субстрату та стабільністю в різних умовах середовища.

У контексті поставленого завдання – виділення та характеристики колагенолітичних ензимів – аналіз активності білкових фракцій із використанням колагену як субстрату є особливо інформативним і доцільним. Як видно з представлених даних (рис. 7А, 7Б), окремі фракції містять протеїнази, здатні до ефективного гідролізу колагену, що підтверджує присутність специфічних колагеназ у пробах.

Варто зазначити, що активність виявлено переважно у фракціях із молекулярною масою близько та вище 44 кДа, тоді як ензими з

молекулярною масою нижче 20 кДа не демонстрували здатності до розщеплення колагену. Такі результати свідчать про спектр протеїназ різної молекулярної маси, що характеризуються відмінною субстратною специфічністю – зокрема, до колагену та желатину.

Додатковий експеримент із застосуванням фібриногену як субстрату (рис. 8) дозволив виявити ферментативну активність виключно в одній фракції, отриманій з тканин морського їжака *Sterechinus neumayeri*, причому лише у фракції, елюйованій з хроматографічного носія (рис. 8А). Така специфічна активність свідчить про присутність протеїнази з вузькою субстратною селективністю, здатної гідролізувати фібриноген. Враховуючи, що фібриноген є складним білком з обмеженим числом доступних протеолітичних сайтів, подібна активність вказує на високий рівень специфічності ензиму, що може мати прикладне значення в медико – біологічних дослідженнях.

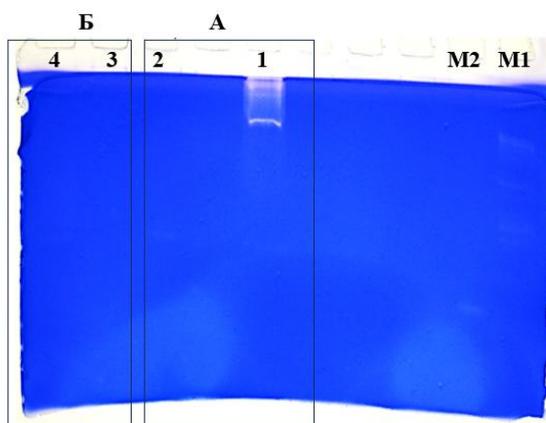


Рис. 8. Ензим – електрофореграма (субстратний білок фібриноген) фракцій протеолітичних ферментів з гідробіонтів Антарктичного регіону: М1 – плазмін (84 кДа); М2 – трипсин (23 кДа); А – аналіз фракції протеолітичних ферментів, очищених з гомогенату *Sterechinus neumayeri*: 1 – фракція, що зв’язалась з Q – сефарозою; 2 – фракція, що не зв’язалась з Q – сефарозою; Б – аналіз фракції протеолітичних ферментів, очищених з гомогенату *Odontaster validus*: 3 – фракція, осаджена при додаванні насиченого розчину сульфату амонію; 4 – фракція, що зв’язалась з Q – сефарозою

Узагальнюючи отримані результати, можна зробити висновок про наявність у досліджуваних зразках спектру протеїназ із різною молекулярною масою та субстратною специфічністю, зокрема до колагену, желатину та фібриногену. Така різноманітність активностей підтверджує потенціал подальшого фракціонування та індивідуальної характеристики ензимів з огляду на їхнє біотехнологічне застосування.

Одним із пріоритетних завдань цього дослідження було оцінити ефективність композицій на основі колагенолітичних ферментів, отриманих із гідробіонтів Антарктичного регіону, як потенційних засобів для стимуляції репарації ушкоджених тканин. У цьому контексті нами було проаналізовано здатність очищених фракцій протеолітичних ферментів до гідролізу фібрину – одного з ключових компонентів, що бере участь у процесах гемостазу та регенерації.

Фібрин є високомолекулярним білком, який утворюється внаслідок ферментативного перетворення фібриногену під дією тромбіну. Він формує тривимірну мережу згустків, що становить основу тромбу при згортанні крові. Окрім гемостатичної функції, фібрин відіграє важливу роль у загоєнні ран: він покриває ранову поверхню, ізолює її від зовнішнього середовища та утворює тимчасовий фібриновий матрикс, який слугує субстратом для міграції клітин, зокрема фібробластів і кератиноцитів [38, 39].

Варто зазначити, що той факт, що досліджувані ферментні фракції не проявляли активність щодо фібриногену, не виключає потенційної здатності до розщеплення фібрину, який має іншу структурну організацію та стабільність. Тому оцінку фібринолітичної активності проводили у двох модельних системах: 1) на фібрині, утвореному шляхом додавання тромбіну до очищеного фібриногену; 2) на фібрині, що формувався безпосередньо в плазмі крові.

Такий диференційований підхід дозволив дослідити не лише загальну здатність ферментів до руйнування фібринової матриці, а й визначити чутливість їхньої активності до дії фізіологічних ефекторів, присутніх у плазмі.

Результати експериментів (рис. 9А, 9Б) свідчать про різну ступінь фібринолітичної активності у досліджуваних фракціях. Обидві фракції – з морського їжака *Sterechinus neumayeri* та морської зірки *Odontaster validus* – не проявляли активності щодо фібрину, утвореного в плазмі крові. Водночас у моделі з очищеним фібриногеном було зафіксовано незначне розщеплення фібринового згустку, причому фракція з *O. validus* виявила вищу активність, порівняно з ферментами з *S. neumayeri*.

Отримані результати вказують на можливу наявність у плазмі крові фізіологічних інгібіторів протеїназ, які блокують активність ензимів гідробіонтного походження [40]. До таких інгібіторів належать, зокрема, α_2 – макроглобулін, антитромбін III, серпінові білки тощо, які забезпечують регуляцію протеолітичного каскаду в системі гемостазу.

Загалом, відсутність гідролізу фібрину, сформованого у плазмі, а також обмежена активність у експерименті з очищеним фібриногеном, свідчить про високу селективність ензимів. Це відкриває перспективи використання досліджуваних фракцій у складі комплексної терапії ран, у поєднанні з фібриновими матрицями та клеями, які широко застосовуються як біоматеріали для доставки клітин або фармакологічних агентів, а також для моделювання контрольованого середовища регенерації. Завдяки вибірковій активності такі ферменти можуть забезпечувати ефективно очищення ранової поверхні без порушення структур фібринового каркасу, що необхідний для подальшої тканинної інтеграції.

Отже, у результаті застосування методу іонообмінної хроматографії з гомогенатів тканин гідробіонтів Антарктичного регіону було отримано фракції протеолітичних ензимів, які демонструють різну субстратну

специфічність. Хроматографічне розділення дозволило виокремити цільові ензимні комплекси, потенційно активні щодо колагену, желатину та фібрину.

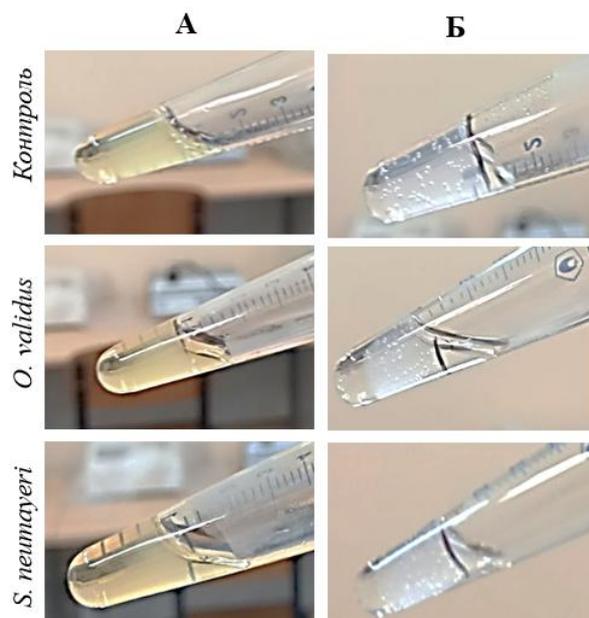


Рис. 9. Фотографії, що демонструють вплив фракцій протеолітичних ферментів, очищених з гомогенатів тканин гідробіонтів Антарктичного регіону, на розщеплення фібринового згустку: А – фібриновий згусток, утворений при додаванні тромбіну до плазми крові; Б – фібриновий згусток, утворений при додаванні тромбіну до чистого фібриногену

Порівняльний аналіз ензимної активності відносно вмісту загального білка у вихідних пробах дозволяє зробити низку важливих висновків. Зокрема, показники активності в зразках, отриманих із *Diplulmaris antarctica*, виявилися недостатніми для подальшого розгляду цього виду як перспективного джерела ензимів у межах даного дослідження. Натомість біологічні ресурси *Odontaster validus* та *Sterechinus neumayeri* виявили високу специфічну активність щодо колагену, що дає підстави розглядати ці гідробіонти як потенційно ефективну сировину для одержання колагенолітичних ензимів біомедичного або біотехнологічного призначення.

Біохімічна характеристика колагенолітичних ензимів гідробіонтного походження: специфічність, інгібування та механізм дії

Колагенази, як представники класу протеолітичних ензимів, синтезуються клітинами у вигляді неактивних попередників (пре – проензимів), які у процесі дозрівання перетворюються у проферменти та лише після відповідної активації набувають каталізуючої здатності. Такий механізм є універсальним регуляторним етапом у біосинтезі більшості гідролаз і забезпечує контрольоване включення ензимів у метаболічні або регенераційні процеси, запобігаючи передчасній або надмірній деградації білкових структур.

Залежно від особливостей будови активного центру, механізму каталізу та фізіологічної функції, колагенолітичні ензими класифікують на дві основні групи: серинові та металозалежні (металопротеїнази) (табл. 2).

У серинових колагеназах каталіз здійснюється за рахунок нуклеофільної атаки пептидного зв'язку залишком серину, що входить до триади активного центру. У металопротеїназах активність обумовлена присутністю іонів двовалентних металів (найчастіше цинку), які координуються у активному центрі і відіграють ключову роль у гідролітичному розриві пептидних зв'язків.

Таблиця 2. Порівняння серинових і металозалежних колагеназ

| Характеристика | Серинові колагенази | Металозалежні колагенази |
|-------------------|------------------------------------|--|
| Активний центр | Серин | Цинк |
| Джерела | Бактерії (<i>Clostridium</i>) | Людина, тварини, бактерії |
| Фізіологічна роль | Інфекції, руйнування тканин | Ремодельовання матриксу, регенерація |
| Інгібітори | Немає специфічних | Тканинний інгібітор металопротеїназ (TIMP) |
| Застосування | Лікування контрактур, очищення ран | Вивчення патологій, терапевтичні цілі |

Другим завданням даного дослідження було здійснити комплексну біохімічну характеристику очищених протеолітичних фракцій з тканин гідробіонтів *Odontaster validus* та *Sterechnus neumayeri*, зокрема охарактеризувати їхню активність залежно від природи активного центру, визначити субстратну специфічність, температурний – та рН – оптимум дії, а також оцінити стабільність ензимів в умовах, що імітують виробничі біотехнологічні процеси.

Для ідентифікації типу протеїназ було використано метод інгібіторного аналізу з використанням специфічних інгібіторів: соєвого інгібітору трипсинів для серинових ензимів та ЕДТА (етилендіамінтетраоцтова кислота) для металозалежних. Субстратом у реакції слугував казеїн – стандартний модельний білок для визначення загальної протеолітичної активності.

Відповідно до отриманих результатів (рис. 10), фракції, очищені з тканин *Odontaster validus*, характеризувалися переважанням металозалежних ензимів: додавання ЕДТА знижувало загальну протеолітичну активність на 67%, що свідчить про вагому частку металопротеїназ у складі ферментного комплексу. Натомість інгібування соєвим інгібітором, специфічним для серинових протеїназ, спричиняло зменшення активності приблизно на 30%, вказуючи на їх меншу, хоча й помітну присутність.

У фракціях, отриманих із *Sterechnus neumayeri* (рис. 10), спостерігалася інша картина: інгібування активності соєвим інгібітором становило 44%, що вказує на більший внесок серинових ензимів у загальну протеолітичну активність. Водночас ефект від додавання ЕДТА був менш

вираженим (34%), що демонструє більш збалансований розподіл між металозалежними та сериновими протеїназами.

Оскільки передбачуваним напрямком практичного застосування колагенолітичних ензимів у межах цього дослідження є створення композицій для очищення гнійно – некротичних ран, високий вміст металозалежних ензимів у фракції з *O. validus* потребує особливої уваги. Це пов'язано з тим, що у фізіологічних умовах активність металопротеїназ суворо контролюється тканинними інгібіторами металопротеїназ (ТИМР), що може потенційно обмежити ефективність таких ензимів у клінічному застосуванні.

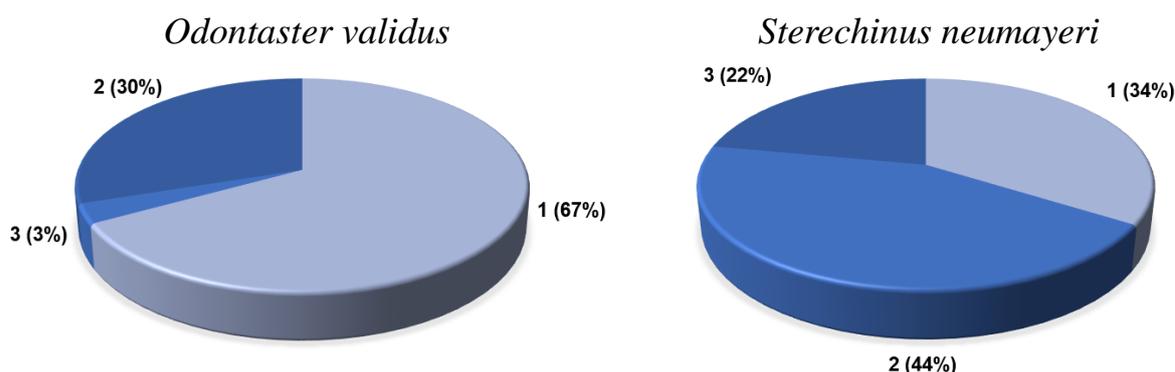


Рис. 10. Внесок ферментів з різною будовою активного центру у загальну протеолітичну активність: 1 – металозалежні ферменти; 2 – серинові протеїнази; 3 – аспартильні та серинові протеїнази

З метою уточнення субстратної специфічності очищених ензимів було проведено визначення амідазної активності за допомогою хромогенних пептидних субстратів $N - \alpha - \text{benzoyl} - DL - \text{Arg} - pNA$ та $H - D - \text{Val} - \text{Leu} - \text{Lys} - pNA$, які є синтетичними аналогами природних білкових субстратів. Обидва субстрати характеризуються специфічністю до серинових протеїназ, що дозволяє з високою точністю визначити їхню активність.

Як показано в табл. 3, ензими обох видів гідробіонтів продемонстрували значно вищу активність щодо субстрату $H - D - \text{Val} - \text{Leu} - \text{Lys} - pNA$, що містить залишок лізину в P1 – позиції, порівняно із субстратом на основі аргініну. Така різниця може свідчити про переважну орієнтацію ферментів на гідроліз зв'язків із участю лізинових залишків, що є важливим при підборі умов застосування таких ензимів. Ферменти з *S. neumayeri* мали більшу активність до $N - \alpha - \text{benzoyl} - DL - \text{Arg} - pNA$, тоді як ферменти з *O. validus* були ефективнішими щодо $H - D - \text{Val} - \text{Leu} - \text{Lys} - pNA$, що додатково підтверджує гетерогенність ферментних систем.

Таким чином, проведені інгібіторні та субстратні дослідження дозволяють зробити висновок про наявність у фракціях ензимів обох основних типів – серинових і металозалежних протеїназ – з різним внеском до загальної активності. Такі властивості є важливими для подальшої оптимізації умов застосування ензимних композицій у біомедичних або

промислових процесах, де критичною є вибіркова дія ензимів залежно від типу білкової мішені.

Таблиця 3. Активність ферментів, очищених з гомогенатів тканин гідробіонтів Антарктичного регіону, щодо деяких хромогенних субстратів ($M \pm m, n=6$)

| Гідробіонт | $N - \alpha - \text{benzoyl} - \text{DL} - \text{Arg} - \text{pNA}$ | $\text{H} - \text{D} - \text{Val} - \text{Leu} - \text{Lys} - \text{pNA}$ |
|------------------------------|---|---|
| | мкмоль пНА/хв·мг білка | |
| <i>Odontaster validus</i> | 6,96±0,35 | 155,45±7,82 |
| <i>Sterechinus neumayeri</i> | 8,16±0,5 | 25,70±3,17 |

У межах наступного етапу дослідження було проведено розгорнуту біохімічну характеристику протеолітичних ензимів, ізольованих з гідробіонтів *Odontaster validus* та *Sterechinus neumayeri*. Зокрема, визначалися температурний і рН оптимуми активності, а також стабільність ензимів за умов, наближених до фізіологічних і промислових параметрів. З огляду на походження досліджуваних організмів з холодноводних екосистем, особливу увагу було приділено температурній залежності активності, що дозволяє оцінити потенціал ензимів для застосування в умовах низьких температур.

Аналіз температурної залежності показав, що ензими з *O. validus* демонструють максимальну активність при +60 °С, а з *S. neumayeri* – при +65 °С (рис. 11). Криві активності мали дзвіноподібну форму з різким спадом після досягнення температурного піку, що свідчить про термодеструкцію молекул при подальшому нагріванні. У цілому встановлене нами значення температурного оптимуму для протеїназ з гідробіонтів *Sterechinus neumayeri* та *Odontaster validus* було вищим, ніж для багатьох ферментів з організмів, адаптованих до низьких температур існування (+20 – 40 °С). Разом з тим, показник температурного оптимуму співпадав з таким для деяких гідробіонтів Антарктичного регіону – камчатського краба *Paralithodes camtschatica* та антарктичного криля *Euphausia superba* [41, 42]. Згідно літератури, температурний оптимум колагеназ значно варіює залежно від їхнього походження. Так, для колагеназ з наземних організмів температурний оптимум зазвичай знаходиться при +35 – 45°С. Температурний оптимум колагенази з гідробіонтів різниться для різних організмів, що пов'язано з умовами середовища їх існування: для морських риб (наприклад, ферменти з тріски чи лосося) – це +20 – 30°С, для глибоководних організмів температурний оптимум може бути навіть нижчим – +10 – 20°С, що відображає їх адаптацію до холодних умов середовища. У той час як температурний оптимум, наприклад, трипсинів з риб тропічних чи помірних широт є значно вищим і складає +50 °С для сардини [43], +55 °С для кефалі і тріски [44]. Варто згадати й про екстремофільних організмів для яких температурний оптимум може перевищувати +50 – 70°С, хоча це рідко

зустрічається серед гідробіонтів, тим більше серед організмів, адаптованих до понижених температур існування. Навпаки, білки психрофільних організмів, (температура середовища існування зазвичай нижче +5°C) мають унікальні властивості, що забезпечують їхню функціональність у таких умовах. Однією з ключових характеристик цих білків є термолабільність, тобто підвищена чутливість до високих температур. Саме тому білки психрофільних організмів легко денатурують при помірному підвищенні температури (зазвичай +30 – 40°C). Це пов'язано з меншою, у порівнянні з білками термофільних або мезофільних організмів, кількістю внутрішньомолекулярних стабілізуючих зв'язків, таких як водневі зв'язки та гідрофобні взаємодії; нижчою щільністю упаковки амінокислотних залишків; більшою кількістю гнучких ділянок, що підвищує їх рухливість. Саме знижена стабільність допомагає ферментам залишатися гнучкими й функціональними при низьких температурах, де рухливість молекул обмежена.

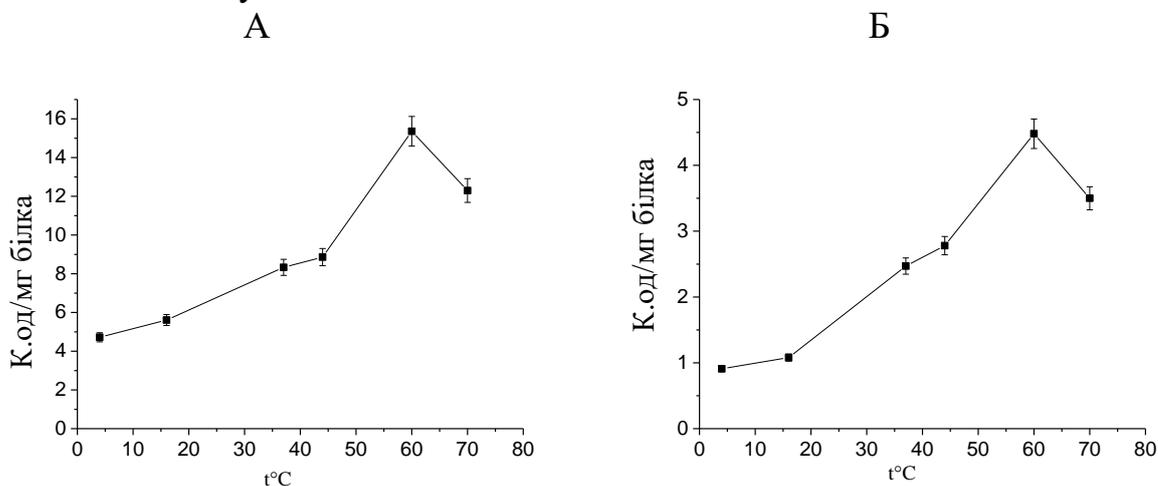


Рис. 11. Залежність активності протеолітичних ферментів, очищених з гомогенату тканин *Odontaster validus* (А) та *Stereichinus neumayeri* (Б), від температури

Як уже зазначалося, у нашому дослідженні ферменти з таких гідробіонтів Антарктичного регіону, як *Odontaster validus* та *Stereichinus neumayeri*, навпаки характеризуються більшою стійкістю молекули, що робить їх стійкішими до підвищення температури.

Надалі було визначено оптимальне для прояву ферментативної активності значення рН. Як видно з рис. 12, ферментативна активність у обох досліджуваних фракціях протеолітичних ферментів була досить низькою при рН нижче 4,0; поступово зростала при підвищенні значень рН і досягала свого максимуму при рН 9,0 для ферментів з *Odontaster validus* та при рН 8,0 – 9,0 для ферментів з *Stereichinus neumayeri*.

Прояв максимальної ферментативної активності в області лужних значень рН дозволяє говорити про належність ферментів, очищених з обох гідробіонтів саме до лужних протеїназ. Відповідно до літератури, ферменти з рН оптимумом вище 10,0 виділено з низки мікроорганізмів

[45], грибів [46], дріжджів [47], актиноміцетів [48, 49], у той час як рН оптимум колагеназ ссавців зазвичай знаходиться при рН близько 7,0.

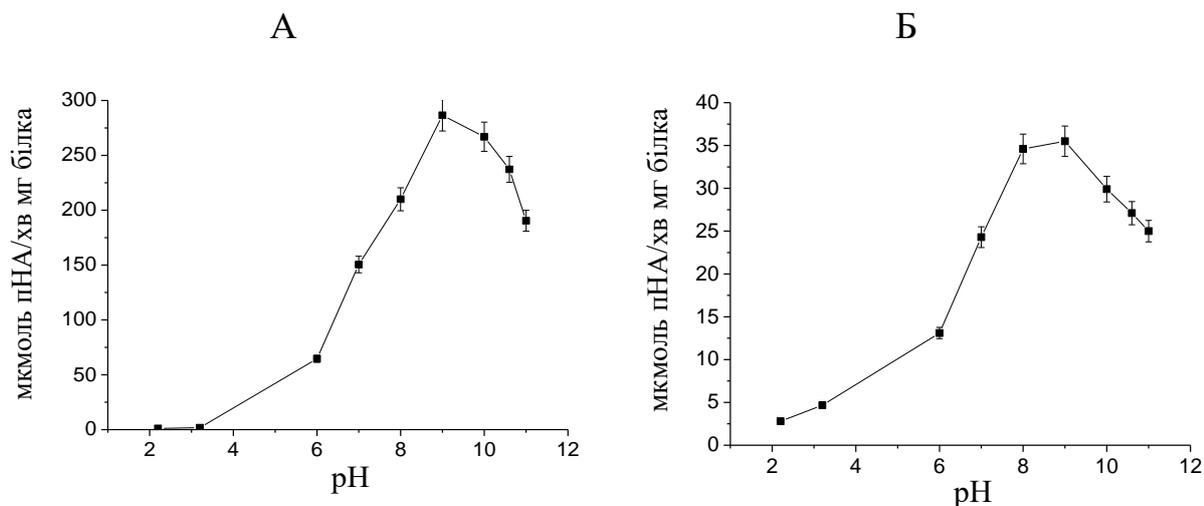


Рис. 12. Залежність активності протеолітичних ферментів, очищених з гомогенату тканин *Odontaster validus* (А) та *Stereichinus neumayeri* (Б), від значень рН

Зазвичай джерелом лужних протеаз слугують мікроорганізми. Враховуючи значний біотехнологічний потенціал лужних протеаз, зокрема їх застосування на різних етапах технологічних процесів обробки сировини у шкіряній, текстильній промисловості; включення до складу миючих засобів; використання у харчовій промисловості, а також під час відновлення фото – , рентгенівських плівок та регенерації срібла, виявлення альтернативних джерел лужних протеаз є досить перспективним не лише з позицій їх застосування у медицині, а й для можливого впровадження у вітчизняне біотехнологічне виробництво, що сприятиме здешевшанню продукції на тлі покращення її якості.

Беручи до уваги, що згідно мети дослідження, основним напрямком використання колагенолітичних ферментів, очищених з гідробіонтів, є створення ранозагоювальних засобів, виявлений нами рН оптимум колагеназ з гідробіонтів Антарктичного регіону є позитивною характеристикою, оскільки дозволяє здійснювати контрольовану регуляцію активності ферментів у залежності від стадії та інтенсивності патологічного процесу.

Відомо, що рН гнійно – некротичних ран змінюється у залежності від стадії рани. Так, на початковій стадії під час гострого запального процесу рН середовища зазвичай підвищений (7,1–8,5), що створює сприятливе середовище для розвитку багатьох патогенних мікроорганізмів, таких як *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* та інші. У міру накопичення гнійного ексудату та продуктів розпаду тканин рН може зміщуватися у бік кислих значень (рН 5,5–6,5) через метаболічну активність бактерій та зниження кисню в тканинах. Тому використання засобів, що містять ферменти, які проявляють максимальну активність в області лужних

значень рН, може бути особливо доцільним саме на початку патологічного процесу. Крім того, аплікації на ранову поверхню композицій чи мазей на основі колагенолітичних ферментів з *Sterechninus neumayeri* та *Odontaster validus* з лужним значенням рН можна використовувати як засіб регуляції рН рани задля створення оптимальних умов для репарації тканин за одночасного очисного ефекту ферментів.

Надалі нами було перевірено чи зберігають ферменти, очищені з гідробіонтів Антарктичного регіону, активність після їх тривалої інкубації за лужних значень рН. Збереження активності ферменту безпосередньо пов'язано із стабільністю молекули, що має особливо важливе значення для ферментів, що включені до складу ранозагоювальних засобів. Збереження стабільності ферментів є необхідною умовою забезпечення ефективності препарату, якщо фермент нестабільний, він може стати неактивним до моменту застосування, що зменшує ефективність засобу. Нестабільний фермент може спричинити утворення продуктів розпаду, які можуть подразнювати тканини, викликати алергічні реакції або токсичність. Крім того, стабільність ферментів у складі препаратів значно підвищує їх комерційну цінність, адже це дозволяє виготовляти засоби з тривалим терміном зберігання без втрати якості, що, безумовно, важливо для комерційного розповсюдження та зручності використання пацієнтами.

Для ранозагоювальних засобів важливо, щоб фермент зберігав стабільність і активність у специфічних умовах рани, таких, наприклад, як вологе середовище, різні рівні рН (від кислого до лужного) та температура тіла (~37 °С). Оскільки згідно завдань дослідження, фракції протеолітичних ферментів з гідробіонтів Антарктичного регіону передбачається використовувати для створення засобів лікування гнійно – некротичних ран, тобто ран, рН середовища яких у гостру стадію є лужним, нами було оцінено чи впливає 3 – х годинна інкубація ферментів у буферах у діапазоні рН від 8,0 до 11,0 на прояв ферментативної активності. Для порівняння результатів у цій серії експериментів також визначали активність ферментів, які не інкубували у відповідних буферах, а відразу вимірювали значення оптичної щільності проб. Результати, отримані в ході дослідження, узагальнено у табл. 4 і табл. 5.

Таблиця 4. Активність протеолітичних ферментів (мкмоль пНА/хв на мг білка), очищених з гомогенату тканин *Odontaster validus*, після інкубації у буферах з лужним значенням рН ($M \pm m$, n=6)

| Умови | значення рН | | | |
|-----------------|-------------|------------|------------|------------|
| | 8,0 | 9,0 | 10,0 | 11,0 |
| 3 год інкубації | 186,9±9,3 | 273,5±11,2 | 274,0±12,3 | 238,5±9,7 |
| Без інкубації | 197,6±7,8 | 270,5±10,0 | 266,9±12,0 | 215,6±10,5 |

Як бачимо, інкубація фракцій ферментів, очищених з гомогенату тканин гідробіонтів *Odontaster validus* та *Sterechninus neumayeri*, у буферах зі значенням рН 8,0; 9,0; 10,0 та 11 не приводила до зниження

ферментативної активності, навпаки спостерігалось навіть певне зростання активності у досліджуваних фракціях, зокрема при рН вище 9,0. Подібний ефект було виявлено для обох гідробіонтів.

Таблиця 5. Активність протеолітичних ферментів (мкмоль пНА/хв на мг білка), очищених з гомогенату тканин *Sterechinus neumayeri*, після інкубації у буферах з лужним значенням рН ($M \pm m$, $n=6$)

| Умови | значення рН | | | |
|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | 8,0 | 9,0 | 10,0 | 11,0 |
| 3 год інкубації | 37,0 \pm 1,8 | 44,9 \pm 2,1 | 42,6 \pm 2,0 | 37,0 \pm 1,5 |
| Без інкубації | 38,1 \pm 1,8 | 34,5 \pm 1,5 | 28,0 \pm 1,5 | 23,5 \pm 1,3 |

Примітно, що ферментативна активність у фракції, очищеній з *Odontaster validus*, при 3 – х годинній інкубації рН 11,0 була навіть вищою ніж при рН 8,0 – 238,5 \pm 9,7 мкмоль пНА/хв на мг білка і 186,9 \pm 9,3 мкмоль пНА/хв на мг білка, відповідно. Для ферментів з *Sterechinus neumayeri* такого ефекту виявлено не було – активність зберігалась на рівні 37,0 \pm 1,8 мкмоль пНА/хв на мг білка за значень рН 8,0 та 11,0.

Як уже згадувалося вище, для білків з організмів, що існують за понижених температур середовища, характерна гнучкість та лабільність молекули, що обумовлює зниження їх стійкості до дії зовнішніх чинників. Проте наші результати, навпаки, слугують підтвердженням дещо вищої стабільності білкових молекул з гідробіонтів *Sterechinus neumayeri* та *Odontaster validus*.

Оцінка ранозагоювального потенціалу колагенолітичних ферментів, очищених з тканин гідробіонтів Антарктичного регіону, на моделі гнійно – некротичних ран у щурів

Проаналізувавши сучасну наукову літературу з проблематики терапії ран, можна зробити висновок про широке і доволі активне використання колагенолітичних ензимів у лікуванні різноманітних типів ушкоджень шкірного покриву. Ці ензими демонструють клінічну ефективність при лікуванні гострих та хронічних ран – зокрема, діабетичних та трофічних виразок, пролежнів, а також травматичних і післяопераційних дефектів. Вони активно застосовуються при інфікованих ранах, де завдяки здатності до гідролізу білкових компонентів бактеріальних біоплівки, колагенолітичні ензими сприяють не лише ефективному очищенню ранової поверхні, але й покращують дифузію антибіотиків та імунних клітин у вогнище ураження, посилюючи антимікробний ефект.

Окрему нішу становлять опікові ураження, де ферментативне видалення зруйнованих білкових структур, насамперед некротичного детриту, сприяє формуванню грануляційної тканини, знижує запалення та ризик інфікування. Подібна стратегія дозволяє уникати агресивних методів хірургічного дебрідменту, зберігаючи життєздатні тканини.

Серед усіх типів уражень, гнійно – некротичні рани залишаються одними з найбільш складних для терапії. Їх патогенез включає розвиток

хронічного запалення, інтенсифікацію тканинного некрозу, накопичення гнійного ексудату, а також колонізацію патогенами, часто резистентними до традиційних антибіотиків. Крім того, мікрооточення таких ран – зазвичай гіпоксичне, із порушеним мікроциркуляторним забезпеченням і високим вмістом цитотоксичних метаболітів, що пригнічують репаративні процеси та пошкоджують сусідні життєздатні клітини.

У зв'язку з цим, розробка ензимвмісних композицій на основі колагеназ для селективного очищення рани, зниження бактеріального навантаження, оптимізації рН середовища, а також стимуляції утворення грануляційної тканини й епітелізації, є одним із найперспективніших напрямів сучасної ранової терапії. Окремо слід наголосити на потенціалі ензимів із гідробіонтів як альтернативи мікробним або тваринним протеїназам, з огляду на їх високу активність, термостабільність, біосумісність та низький ризик імуногенності.

Нормальний процес загоєння ран є багатоступеневим та контрольованим, і включає послідовні фази запалення, проліферації та ремоделювання тканин. Порушення перебігу хоча б одного з цих етапів може призвести до затримки або хронізації ранового процесу, що, у свою чергу, супроводжується формуванням грубих, гіпертрофічних або келоїдних рубців. Подібні наслідки мають не лише функціональні ускладнення (наприклад, обмеження рухливості при локалізації рубця в ділянці суглоба), а й естетичні, що може значно впливати на соціальну адаптацію та психоемоційний стан пацієнтів. Саме тому своєчасне лікування ран є важливою складовою комплексної медичної допомоги.

Беручи до уваги патофізіологічні особливості гнійно – некротичних ран, для оцінки терапевтичного потенціалу протеолітичних ензимів, очищених із гідробіонтів Антарктичного регіону, нами було розроблено мазеву композицію на основі 0,6 % карбополу – сучасного біосумісного гелеутворювача, що забезпечує оптимальну консистенцію препарату, легкість нанесення, стабільність ензимів і тривалий контакт з рановою поверхнею.

Вибір саме маzewої форми обумовлений рядом факторів, зокрема здатністю підтримувати вологе середовище у зоні ураження, що є важливою умовою ефективного загоєння, відповідно до принципів сучасної терапії ран [50]. Відомо, що зволене середовище сприяє міграції кератиноцитів, зменшує формування струпу та знижує інтенсивність больового синдрому. Крім того, шар мазі на поверхні ураження виконує функцію фізичного бар'єра, перешкоджаючи контамінації рани умовно – патогенною флорою, що знижує ризик розвитку вторинного інфікування та утворення гнійно – некротичних ускладнень.

До складу маzewої композиції було введено суміш протеолітичних ензимів, ізольованих та очищених із гомогенату тканин *Stereichinus neumayeri* та *Odontaster validus*, представників антарктичної морської фауни, чия ферментативна система демонструє високу активність у широкому діапазоні рН і температур. Така комбінація ензимів дозволяє поєднати переваги серинових і металозалежних протеїназ, забезпечуючи

більш широкий спектр дії на компоненти некротичних мас і зміненого позаклітинного матриксу.

Таким чином, створена мазева форма є не лише носієм біологічно активних молекул, але й активним компонентом лікування, що забезпечує селективне ензимне очищення ран, створення сприятливого мікросередовища для репарації та, потенційно, зменшення ризику формування патологічних рубців у пізніші фази загоєння.

Незалежно від етіології ураження, загоєння включає типові фази – гемостаз, запалення, проліферація (утворення грануляційної тканини та епітелізація), ремоделювання (утворення матриксу та відновлення тканин), які перекриваються у часі й не мають чітких меж між собою [51]. Такий розподіл є умовним, однак відображає послідовність ключових біологічних подій у процесі репарації тканин. Згідно з літературними даними, запальна фаза триває 2 – 3 доби, проліферативна активується з 4 – 5 доби й триває до 2 – 3 тижнів, тоді як ремоделювання може зайняти від кількох місяців до 2 років [52]. Відповідно до такого фазового поділу, у нашому дослідженні оцінку площі гнійно – некротичних ран здійснювали через кожні три доби, починаючи з нульової точки – моменту видалення струпа, який припадав на 5 добу після підшкірного введення індуктора (10% розчину CaCl_2). Результати дослідження наведені в табл. 6.

На початковому етапі експерименту (0 доба) середня площа гнійно – некротичних ран у тварин обох груп була приблизно однаковою, що підтверджує стандартизованість моделі. Уже на 6 добу ранозагоєння у групі тварин, які отримували лікування у формі ензимної композиції, було помітно прискоренням – показники площі рани були на 18 – 20 % нижче показників контрольної групи. До 9 доби ця різниця стала статистично значущою: ранова поверхня у дослідній групі скоротилася майже вдвічі порівняно з контрольною. За наступні три доби ця перевага зберігалася, і до 12 доби інтенсивність гоєння в дослідній групі перевищила контроль майже у 2 рази. На 18 добу ранова поверхня у тварин дослідної групи майже зникла, досягнувши лише кількох квадратних міліметрів, тоді як у контрольній групі все ще залишалась помітною.

Остаточна епітелізація відбулася на 27 добу в групі тварин, які отримували лікування ензимною композицією, тоді як у контрольних тварин повне загоєння спостерігали лише на 30 добу. Таким чином, застосування композиції на основі протеолітичних ферментів з *S. neutaueri* та *O. validus* сприяло прискоренню загоєння ран, що підтверджено статистично достовірним зменшенням площі ранової поверхні на ключових часових точках (табл 6).

Наочним підтвердженням ефективності розробленої мазевої композиції на основі колагенолітичних ензимів слугують фотодокументальні матеріали, що демонструють динаміку процесу загоєння гнійно – некротичних ран на фоні її застосування (рис. 13).

Таблиця 6. Площа ранової поверхні у контрольній та дослідній групах щурів з моделлю гнійно – некротичного ураження шкіри (мм², M ± SD, n = 8)

| Доба | Експериментальна група | |
|------|------------------------|----------------|
| | Контроль | Дослід |
| 0 | 136,4±5,3 | 130,2±16,2 |
| 3 | 108,0±6,4 | 114,4±9,3 |
| 6 | 106,0±7,2 | 87,0±16,0 |
| 9 | 102,0±6,4 | 60,4±19,7* |
| 12 | 49,8±6,9 | 24,4±6,7* |
| 18 | 26,6±8,9 | 5,8±0,14* |
| 21 | 15,6±8,5 | 2,0±0,08* |
| 24 | 3,2±0,06 | 0,4±0,02* |
| 27 | 0,2±0,01 | Повне загоєння |
| 30 | Повне загоєння | – |

* $p < 0,05$ порівняно з контролем на відповідному часовому інтервалі

Представлені зображення дозволяють візуально оцінити ступінь очищення ранової поверхні, зменшення зони некрозу та прогресуючу епітелізацію, що в сукупності свідчить про клінічно значущий терапевтичний ефект композиції.



Рис. 13. Фотографії гнійно – некротичних ран при нанесенні на ранову поверхню композиції на основі суміші протеолітичних ферментів, очищених з гідробіонтів Антарктичного регіону

Попри численні перспективи використання колагенолітичних ензимів у лікуванні ран, розробка ефективних терапевтичних засобів на їх основі пов'язана з низкою важливих біотехнологічних викликів. Серед них – необхідність забезпечення стабільності ензимів у складі лікарських форм, мінімізація ризику побічних ефектів, зокрема неконтрольованої деградації життєздатних тканин, а також оптимізація способів доставки активних компонентів (креми, гелі, аплікації, біоматрикси тощо). У цьому контексті використання протеолітичних ензимів із гідробіонтів

Антарктичного регіону є надзвичайно перспективним рішенням, що дозволяє успішно подолати або суттєво знизити зазначені проблеми.

По – перше, очищені фракції, отримані з видів *Stereochinus neumayeri* та *Odontaster validus*, являють собою комплекс біологічно активних ензимів з різною будовою активного центру (серинові та металозалежні протеїнази), що забезпечує широкий спектр субстратної специфічності і високу ефективність гідролізу компонентів ранового матриксу. Проведені дослідження демонструють, що ці ензими ефективно розщеплюють колаген та желатин, але практично не проявляють активності щодо фібрину. Це має важливі практичні наслідки. З одного боку, така специфічність робить їх оптимальними для застосування на початкових стадіях ранового процесу, коли необхідне делікатне, але ефективне очищення ранового ложа. З іншого боку, відсутність дії на фібринові структури відкриває можливість їх інтеграції до фібринових гелів і матриксів, які сьогодні широко застосовуються як біоматеріали для загоєння ран, завдяки своїй здатності створювати тривимірну сітку, що імітує природний згусток крові та підтримує клітинну проліферацію.

По – друге, присутність у складі композицій ензимів різної природи дозволяє реалізувати селективне регулювання ферментативної активності шляхом застосування специфічних інгібіторів або модифікації рН середовища. З огляду на потенційний ризик пошкодження інтактних тканин при використанні колагеназ, здатність регулювати активність ензимів є надзвичайно важливою з точки зору біобезпеки та терапевтичного контролю. Встановлено, що очищені колагенолітичні ензими з гідробіонтів проявляють максимальну активність у лужному діапазоні рН (8,0–9,0), що відповідає умовам ран у фазі гострого запалення, коли рН середовища підвищений. Таким чином, активність ензимів буде найвищою саме у фазу очищення рани, тоді як у подальших фазах репарації, при зниженні рН до нейтральних або кислих значень, відбудеться природне зниження активності, що запобігатиме надмірній деградації щойно сформованого матриксу.

Наостанок, очищені нами ензими можуть бути адаптовані до різних лікарських форм – мазей, гелів, фібринових або колагенових матриксів, а також присипок, що значно розширює їх терапевтичний потенціал. З урахуванням властивостей отриманих ензимних композицій, їх застосування є доцільним не лише при лікуванні гнійно – некротичних ран, але й при терапії інших типів уражень, включно з хронічними виразками, пролежнями, термічними опіками, травматичними пошкодженнями шкіри, а також післяопераційними ранами.

Висновки.

1. Методом іонообмінної хроматографії на носієві Q – сефароза з гомогенату тканин гідробіонтів Антарктичного регіону *Diplulmaris antarctica*, *Stereochinus neumayeri* та *Odontaster validus* було очищено фракції протеолітичних ферментів. За результатами визначення

колагенолітичної активності та з урахуванням кількості сировини, яка була використана для одержання фракцій, збагачених на колагенолітичні ферменти, обґрунтовано використання видів *Stereochinus neumayeri* та *Odontaster validus*, як джерел ферментів для подальших досліджень.

2. За результатами ензим – електрофоретичного аналізу з використанням низки субстратних білків встановлено здатність ферментів, присутніх у очищених фракціях, ефективно розщеплювати колаген та желатин. Незначну активність щодо фібриногену виявляли лише ферменти з гідробіонту *Stereochinus neumayeri*. Ні в одній з досліджуваних фракцій не було виявлено ферментів, здатних гідролізувати фібриновий згусток, заполімеризований при додаванні до плазми крові тромбіну, разом з тим ферменти з гідробіонтів Антарктичного регіону незначно розщеплювали фібрин, утворений при полімеризації тромбіном чистого фібриногену.

3. Встановлено, що протеолітична активність у фракції, очищеної з гомогенату тканини *Odontaster validus*, на 67% обумовлена металозалежними ферментами і на 30% сериновими протеїназами, у той час як у фракції протеолітичних ферментів з гідробіонту *Stereochinus neumayeri* металозалежні ферменти складають 34%, а серинові протеїнази 44% .

4. Виявлено, що температурний оптимум ферментів з обох досліджуваних гідробіонтів складає +60 °С. Значення рН оптимуму в області лужних значень рН свідчить про належність ферментів, очищених з гомогенату тканини *Odontaster validus* (рН оптимум при 9,0) та *Stereochinus neumayeri* (рН оптимум при 8,0 – 9,0), до лужних протеїназ.

5. Показано, що 3 – х годинна інкубація фракцій протеолітичних ферментів з гідробіонтів Антарктичного регіону у буферах з рН 8,0; 9,0; 10,0 та 11,0 не приводить до зниження ферментативної активності, що опосередковано свідчить про стійкість молекули.

6. Встановлено ранозагоювальний ефект композиції на основі суміші протеолітичних ферментів з гідробіонтів Антарктичного регіону *Odontaster validus* та *Stereochinus neumayeri* на моделі гнійно – екротичних ран у щурів. Нанесення композиції приводило до скорочення термінів епітелізації ран до 27 діб у порівнянні з 30 днями у групі тварин, рани яких гоїлися природним шляхом.

7. Отримані результати обґрунтовують можливість використання фракції колагенолітичних ферментів з гідробіонтів Антарктичного регіону *Odontaster validus* та *Stereochinus neumayeri* як основи для створення ефективних ранозагоювальних засобів для лікування гнійно – некротичних ран, а зазначені гідробіонти розглядати як можливе джерело для отримання ферментів.

Подяки за підтримку науково-дослідної роботи. Автори щиро вдячні Державній установі «Національний антарктичний науковий центр» Міністерства освіти і науки України за всебічну підтримку та організаційне

сприяння у проведенні досліджень. Ми також висловлюємо глибоку подяку Piotr Kuźniar, Miłosz Dąbrowski, екіпажу яхти “Selma” та зимівникам 27 – і Української антарктичної експедиції — Marta Dzyndra та Vasyl Matkivsky — за збір зразків, які були використані у дослідженні та дозволили отримати цікаві і перспективні наукові результати

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Martinengo, L., Olsson, M., Bajpai, R., Soljak, M., Upton, Z., Schmidtchen, A., Car, J., & Järbrink, K. (2019). Prevalence of chronic wounds in the general population: Systematic review and meta – analysis of observational studies. *Annals of Epidemiology*, 29, 8–15.
2. Trakatelli, M., Richard, M., Rouillard, A., Paul, C., Röcken, M., & Stratigos, A. J. (2023). The burden of skin disease in Europe. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 37. doi:10.1111/jdv.19390
3. Krupová, L., & Pokorná, A. (2020). Quality of life in patients with non – healing wounds, with particular focus on assessment tools – a literature review. *Central European Journal of Nursing and Midwifery*, 11(2), 94–103.
4. Palomar – Albert, D., Zamora – Ortiz, J., Palomar – Llatas, F., Escudero – Martínez, M., Naranjo – Cuellar, A., & Pastor – Orduña, M. I. (2025). Longitudinal observational study on quality of life in patients with chronic wounds using DLQI and EQ – 5D. *Medicina*, 61(5), 907.
5. Mathioudaki, E., Vitsos, A., & Rallis, M. C. (2024). Proteolytic enzymes and wound debridement: A literature review. *Wounds*, 36(11), 357–365.
6. Patry, J., & Blanchette, V. (2017). Enzymatic debridement with collagenase in wounds and ulcers: A systematic review and meta – analysis. *International Wound Journal*, 14(6), 1055–1065.
7. Wu, S., Zhou, X., Jin, Z., & Cheng, H. (2023). Collagenases and their inhibitors: A review. *Collagen & Leather*, 5, 19.
8. Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H., & Tomic – Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 16(5), 585–601.
9. Ravanti, L., & Kähäri, V. M. (2000). Matrix metalloproteinases in wound repair (review). *International Journal of Molecular Medicine*, 6(4), 391–798.
10. Li, Y., Lu, Y., Zhao, Y., Zhang, N., Zhang, Y., & Fu, Y. (2024). Deciphering the wound – healing potential of collagen peptides and the molecular mechanisms: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72(47), 26007–26026.
11. Du, C., Li, Y., Xia, X., Du, E., Lin, Y., Lian, J., Ren, C., Li, S., Wei, W., & Qin, Y. (2021). Identification of a novel collagen – like peptide by high – throughput screening for effective wound – healing therapy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 173, 541–553.
12. Krishnaswamy, V. R., Mintz, D., & Sagi, I. (2017). Matrix metalloproteinases: The sculptors of chronic cutaneous wounds. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, 1864(11 Pt B), 2220–2227.
13. Sabino, F., & auf dem Keller, U. (2015). Matrix metalloproteinases in impaired wound healing. *Metalloproteinases In Medicine*, 2, 1–8.
14. Barzkar, N., Babich, O., Sukhikh, S., Venmathi Maran, B. A., Tamadoni Jahromi, S., Luwor, R. B., Sorsa, T., & Das, R. (2024). Exploring the sources and potential applications of marine collagenases. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 58, 103150.
15. Salamone, M., Cuttitta, A., Seidita, G., Mazzola, S., Bertuzzi, F., Ricordi, C., & Ghersi, G. (2012). Characterization of collagenolytic/proteolytic marine enzymes. *Chemical Engineering Transactions*, 27, 1–6.
16. Abramova, M., & Raksha, N. (2019). Development of methodological approaches to the purification of target proteins from marine hydrobionts of Antarctic region. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series Biology*, 78(2), 7–13.

17. Ostapchenko, L., Savchuk, O., & Burlova – Vasilieva, N. (2011). Enzyme electrophoresis method in analysis of active components of haemostasis system. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2, 20–26.
18. Gould, L. J., Yager, D. R., McGeehan, G. M., & Diegelmann, R. F. (1999). Method to analyze collagenase and gelatinase activity by fibroblasts in culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*, 35(2), 75–79.
19. Munilla – Moran, R., & Stark, J. R. (1989). Protein digestion in early turbot larvae, *Scophthalmus maximus* (L.). *Aquaculture*, 8, 315–327.
20. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Analytical Biochemistry*, 2, 248–254.
21. Raksha, N., Halenova, T., Kravchenko, O., Vovk, T., Savchuk, O., & Ostapchenko, L. (2020). Purification and biochemical characterization of trypsin – like enzyme from Antarctic hydrobiont *Adamussium colbecki*. *Research Journal of Biotechnology*, 15(1), 1–7.
22. Aydınöz, S., Süleymanoğlu, S., Haholu, A., Uzun, G., Karademir, F., Yıldız, Ş., & Göçmen, İ. (2007). Hyperbaric oxygen therapy in calcium chloride extravasation injuries: An experimental animal study. *European Journal of General Medicine*, 4(4), 186–189.
23. Pal, G. K., & Suresh, P. V. (2016). Microbial collagenases: Challenges and prospects in production and potential applications in food and nutrition. *RSC Advances*, 6(40), 33763–33780.
24. Barzkar, N., Homaei, A., Hemmati, R., & Patel, S. (2018). Thermostable marine microbial proteases for industrial applications: Scopes and risks. *Extremophiles*, 22, 335–346.
25. Alipour, H., Alipour, H., Raz, A., Zakeri, S., & Dinparast Djadid, N. (2016). Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(11), 975–981.
26. Nezafat, N., Negahdaripour, M., Gholami, A., & Ghasemi, Y. (2015). Computational analysis of collagenase from different *Vibrio*, *Clostridium* and *Bacillus* strains to find new enzyme sources. *Trends in Pharmaceutical Sciences and Technologies*, 1(4), 213–222.
27. Lantis II, J. C., & Gordon, I. (2017). Clostridial collagenase for the management of diabetic foot ulcers: Results of four randomized controlled trials. *Wounds*, 29(10), 297–305.
28. Daboor, S. M., Budge, S. M., Ghaly, A. E., Brooks, M. S., & Dave, D. (2012). Isolation and activation of collagenase from fish processing waste. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3(3), 191–203.
29. Shekhter, A. B., Balakireva, A. V., Kuznetsova, N. V., Vukolova, M. N., Litvitsky, P. F., & Zamyatnin, A. A. (2019). Collagenolytic enzymes and their applications in biomedicine. *Current Medicinal Chemistry*, 26(3), 487–505.
30. Wihastyoko, H. Y. L., Soeharto, S., Widjajanto, E., & Pardjianto, B. (2021). Biological activity of papain and papain – like (cathepsin – K and cathepsin – B) enzymes as therapeutical modality candidates in degrading collagen in abnormal scar. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 14(9), 4957–4962.
31. Shanbhag, T., Abbas, S., & Kothare, A. (2019). An overview of clinical applications of bromelain. *International Journal of Research and Scientific Innovation*, 27(1), 19–30.
32. Barzkar, N., Sheng, R., Sohail, M., Jahromi, S. T., Babich, O., Sukhikh, S., & Nahavandi, R. (2022). Alginate lyases from marine bacteria: An enzyme ocean for sustainable future. *Molecules*, 27(11), 3375.
33. Barzkar, N., Jahromi, S. T., Poorsaheli, H. B., & Vianello, F. (2019). Metabolites from marine microorganisms, micro, and macroalgae: Immense scope for pharmacology. *Marine Drugs*, 17, 464.
34. Wang, Z. Z., Wang, K., Xu, L. F., Su, C., Gong, J. S., Shi, J. S., Ma, X. D., Xie, N., & Qian, J. Y. (2024). Unlocking the potential of collagenases: Structures, functions, and emerging therapeutic horizons. *Biodesign Research*, 6, 0050.

35. Yan, T., & Zhou, A. (2024). Crystallization and crystallographic studies of human serine protease inhibitor (serpin) B9. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 80(Pt 11), 286–293.
36. Park, P. J., Lee, S. – H., Byun, H. G., Kim, S., & Kim, S. – K. (2002). Purification and characterization of a collagenase from the mackerel, *Scomber japonicus*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 35(6), 576–582.
37. Birkedal – Hansen, H., Taylor, R. E., & Fullmer, H. M. (1976). Rabbit alveolar macrophage collagenase: Evidence of polymeric forms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 420(2), 428–432.
38. Laurens, N., Koolwijk, P., & de Maat, M. P. M. (2006). Fibrin structure and wound healing. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4(5), 932–939.
39. Kearney, K. J., Ariëns, R. A. S., & Macrae, F. L. (2022). The role of fibrin(ogen) in wound healing and infection control. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 48(2), 174–187.
40. Sellers, A., & Murphy, G. (1981). Collagenolytic enzymes and their naturally occurring inhibitors. *International Review of Connective Tissue Research*, 9, 151–190.
41. Chen, C. – S., Yan, T. – R., & Chen, H. – Y. (1978). Purification and properties of trypsin – like enzymes and a carboxypeptidase A from *Euphausia superba*. *Journal of Food Biochemistry*, 2, 349–366.
42. Šimat, V., Elabed, N., Kulawik, P., Ceylan, Z., Jamroz, E., Yazgan, H., Čagalj, M., Regenstein, J. M., & Özogul, F. (2020). Recent advances in marine – based nutraceuticals and their health benefits. *Marine Drugs*, 18, 627.
43. Castillo – Yáñez, F. J., Pacheco – Aguilar, R., García – Carreño, F. L., & Navarrete Del Toro, M. (2005). Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterrey sardine (*Sardinops sagax caerulea*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 140, 91–98.
44. Guizani, N., Rolle, R. S., Marshall, M. R., & Wei, C. I. (1991). Isolation and characterization of a trypsin from the pyloric caeca of mullet (*Mugil cephalus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 98, 517–521.
45. Vijay, K. E., Srijana, M., Kiran, K. K., Harikrishna, N., & Reddy, G. (2011). A novel serine alkaline protease from *Bacillus altitudinis* GVC11 and its application as a dehairing agent. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34, 403–409.
46. Guleria, S., Walia, A., Chauhan, A., & Shirkot, C. K. (2016). Purification and characterization of detergent stable alkaline protease from *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 isolated from apple rhizosphere. *Journal of Basic Microbiology*, 56(2), 138–152.
47. Salihi, A., Asoodeh, A., & Aliabadian, M. (2017). Production and biochemical characterization of an alkaline protease from *Aspergillus oryzae* CH93. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94(Pt B), 827–835.
48. Ni, X., Chi, Z., Ma, C., & Madzak, C. (2008). Cloning, characterization, and expression of the gene encoding alkaline protease in the marine yeast *Aureobasidium pullulans* 10. *Marine Biotechnology*, 10(3), 319–327.
49. Elhoul, M. B., et al. (2015). A novel detergent – stable solvent – tolerant serine thiol alkaline protease from *Streptomyces koyangensis* TN650. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 871–882.
50. Gupta, R., Beg, Q. K., Khan, S., & Chauhan, B. (2002). An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 381–395.
51. Fernández Guarino, M., Hernández Bule, M. L., & Bacci, S. (2023). Cellular and molecular processes in wound healing. *Biomedicine*, 11(9), 2526.
52. Schultz, G. S., Chin, G. A., Moldawer, L., & Diegelmann, R. F. (2011). Principles of wound healing. In R. Fitridge & M. Thompson (Eds.), *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists* (Chapter 23). Adelaide: University of Adelaide Press.

1.5 БІОЗАХИСТ ТЕКСТИЛЬНИХ ПОСТІЛЬНИХ ВИРОБІВ З ОБ'ЄМНИМИ НАПОВНЮВАЧАМИ

Михайлова Г. М., Осієвська В. В.

Державний торговельно-економічний університет, Україна

h.mykhaylova@knu.edu.ua, v.osiiyevska@knu.edu.ua

Основним завданням даної роботи було дослідження біозахисту текстильних постільних виробів з об'ємними наповнювачами. Проведено дослідження грибостійкості наповнювачів різної природи без обробки та з біоцидною на основі триклозану. Дослідні зразки піддавали випробуванню на грибостійкість до 6 тестових грибів. Встановлено, що текстильні наповнювачі без біоцидної обробки в умовах підвищеної вологості та оптимальних температур добре піддаються біокорозії, викликаній штамами грибів, а на оброблених біоцидним препаратом «Бактрим», упродовж регламентованого часу видимих ознак росту грибів не виявлено.

Ключові слова: *постільні вироби, біозахист, текстильні наповнювачі, біоцидний препарат*

Суттєвим фактором покращення безпеки життя, здоров'я людей та охорони довкілля є використання товарів, які є безпечними. Постільні вироби, зокрема постільних виробів з об'ємними наповнювачами, мають безпосередній контакт з тілом людини і суттєво впливають на її самопочуття та здоров'я, тому підвищення рівня якості життєдіяльності людини в значній мірі залежить від якості та безпечності цих виробів.

Здатність ковдр, подушок та на матрациків створювати комфортні умови повноцінного відпочинку людини, захищати її організм від несприятливого впливу навколишнього середовища, обумовлює необхідність розширення асортименту цієї групи товарів за рахунок використання новітніх матеріалів та технологій їх виготовлення та оброблення.

Падіння обсягів виробництва постільних виробів в Україні пов'язане з багатьма причинами – фінансовою нестабільністю підприємств, спричиненою руйнуванням усталених виробничих зв'язків під час повномасштабного вторгнення, зростанням цін на сировину, енергоресурси, падінням купівельного попиту тощо. Крім того, виробники стикаються з недостатністю та низькою якістю або відсутністю вітчизняної сировини, що зумовлює закупівлю сировини за кордоном. Неконтрольований імпорт постільних виробів з об'ємними наповнювачами в Україну призводить до зниження конкурентоспроможності продукції, що виготовляється вітчизняними підприємствами. Відсутність інформації про потреби внутрішнього ринку у цій групі товарів не дозволяє розробити обґрунтовану програму їх виробництва.

Сьогодні в Україні успішно працюють текстильні підприємства з випуску постільних виробів з об'ємними наповнювачами, серед яких

можна зазначити ТОВ «Герд Біллербек ГмбХ» (Київська обл.), ТОВ «VLADI» (м. Харків), ПП «ГРЕМ» (м. Львів). ТОВ «Слов'янський пух України» (Запорізька обл.), ТОВ «ТЕКС – СТИЛЬ» (м. Київ), ТОВ «Ярославна» (м. Харків), ТОВ ВТФ «ВЕЛАМ» (м. Миколаїв).

Зважаючи на важкий стан текстильної промисловості України перед нею гостро стоїть проблема якості та безпечності продукції, зокрема постільних виробів з об'ємними наповнювачами. Поряд з традиційними видами наповнювачів (бавовняне волокно, вовна – овеча, кашемірова, верблюжа, натуральний шовк) сьогодні актуальними є можливості зміни у складі наповнювача, зокрема використання нових видів волокон і волокнистих сумішей. Також важливим елементом є застосування сучасних інноваційних технологій їх оброблення біоцидною обробкою з метою поліпшення споживних властивостей.

Перспективи інтеграції до світового ринкову зумовлюють потребу у системному підході до організації виробництва в Україні постільних виробів з об'ємним наповнювачем, що оброблені біоцидними препаратами та відповідають сучасним вимогам, мають необхідний рівень якості та конкурентоспроможності.

Під час експлуатації ковдри, подушки і на матрацники піддаються впливу різних фізико – механічних та біологічних чинників, що призводить до скорочення терміну їх використання та негативної дії на організм людини, зумовлюючи алергічні та інші захворювання. Крім того, вони не підлягають багаторазовому пранню, а їх використання відбувається при підвищеній відносній вологості та температурі повітря.

Проблема біостійкості текстильних матеріалів та виробів набула офіційного визнання й статусу важливого міжнародного науково – практичного напрямку досліджень. Безпечність біоцидів, що застосовуються для обробки вихідної сировини, визначається Європейською Директивою з біоцидних продуктів (European Biocidal Products Directive 98/8/EC). Використання біоцидних препаратів дозволяє гальмувати процеси мікробіологічної деструкції, підвищувати зносостійкість та забезпечувати безпечне використання виробів [1].

Новою сучасною гігієнічною нормою для текстильних матеріалів стало їх оброблення антимікробними засобами. Препарати різної хімічної будови використовуються для боротьби з мікроорганізмами (бактерії, гриби), які знаходяться на текстильному матеріалі. Питання усунення шкідливих мікроорганізмів на текстильних матеріалах необхідно вирішувати для задоволення наявних та передбачуваних потреб в окремих групах виробів [2].

Для запобігання біопошкодження текстильних матеріалів застосовують обробку біоцидними препаратами на основі силану, міді, срібла, фенолу та інших, однак більшість з них наявні в обмеженому асортименті або економічно не вигідні. Це зумовлює необхідність пошуку перспективних вітчизняних безпечних біоцидних препаратів.

Проблема захисту текстильних матеріалів і виробів від мікробіологічного руйнування на сьогодні є досить складною, тому сучасною гігієнічною нормою для текстильних матеріалів стало їх оброблення антимікробними засобами. Для боротьби з мікроорганізмами, що знаходяться на текстильному матеріалі, використовують препарати різної хімічної будови. Якість їх оброблення визначається широтою спектра дії антимікробної речовини, а також ступенем її фіксації [3].

Біопшкодження – це пошкодження сировини, матеріалів або виробів під дією біологічного фактору. Біологічний фактор (біофактор) – це організми або сукупність організмів, що викликають порушення працездатності досліджуваного об'єкту [4].

Одним із напрямів надання нових властивостей текстильним виробам обробка біоцидними препаратами, які здатні затримувати ріст бактерій та грибів або викликати їх загибель. Захист від грибів та бактерій здійснюється різними способами, зокрема: механічним усуненням контакту волокнистого матеріалу зі спорами, бактеріями чи комахами, нанесенням отруйних для мікроорганізмів речовин, хімічною зміною поверхні волокон [5].

Над проблемою оцінки біостійкості одягових текстильних матеріалів працювали відомі вчені І.С. Галик, О.Б. Концевич, Б.Д. Семак [6 – 9], над проблемами підвищенням зносостійкості, біостійкості та антимікробного ефекту текстильних матеріалів працювали М.Є. Рацук, С.Я. Бричка, Н.П. Супрун, Н.І. О.А. Батрак, Л.Є. Галавська [10 – 21] та інші. Науковці вважають, що використання біоцидної обробки текстильних матеріалів та виробів покращує їх споживні властивості, термін їх експлуатації продовжується та досягається відповідний економічний ефект.

Надання текстильним матеріалам біоцидних властивостей залишається важливою та актуальною проблемою легкої промисловості.

Доцільність використання біоцидної обробки для постільних виробів з об'ємними наповнювачами обумовлена цілою низкою причин, зокрема:

- більш широким використанням біоцидних препаратів для забезпечення необхідної безпечності та довговічності наповнювачів для постільних виробів (ковдр, подушок, на матраци тощо), оскільки вони не піддаються багаторазовому пранню;

- мінімізацію біопшкоджень мікроорганізмами натуральних наповнювачів для постільних виробів, експлуатація яких відбувається при досить високій відносній вологості та температурі;

- використанням біоцидних препаратів (біоцидів) на основі триклозану з метою оптимізації (мінімізації) впливу патогенних мікроорганізмів для людини.

Варто відмітити, що до текстильних матеріалів білизняного призначення обов'язково мають бути регламентовані гігієнічні вимоги щодо відсутності в них патогенних видів мікроорганізмів та обмеження целюлозоруйнуючих груп. Відомо, що цвіль, грибок, дріжджі та бактерії є

невід'ємною частиною навколишнього середовища. Тисячі видів мікроорганізмів знаходяться на одязі, на предметах побуту, на тілі людини. Не виключенням є постільні вироби – ковдри, подушки та наматрацники.

Такі натуральні волокна, як: вовняні, бавовняні та штучні бамбукові, евкаліптові схильні до впливу мікроорганізмів через властиві їм характеристики, насамперед як здатність поглинати та накопичувати вологу, а це в свою чергу, забезпечує створення ідеального середовища для розвитку мікроорганізмів.

Розвиток мікроорганізмів погіршує функціональні, гігієнічні та естетичні властивості постільних виробів, зокрема погіршення фарбування, їх руйнування, утворення неприємного запаху, створення небезпеки для життя людини. Найбільш небезпечними мікроорганізмами є гриби та бактерії. Гриби є основною причиною виникнення проблем текстильних виробів: знебарвлення, утворення кольорових плям, пошкодження волокон. Саме бактерії певною мірою пошкоджують волокна і призводять до утворення неприємного запаху, плям та відчуття слизу на постільних виробах [19, 22, 23].

Підвищення обізнаності споживачів щодо гігієни стало необхідністю розвитку антимікробної обробки текстильних матеріалів. Як антимікробну обробку розуміють обробку матеріалів антимікробними речовинами з метою забезпечення контролю числа бактерій на низькому рівні. Тут потрібно зазначити, що антимікробний препарат необхідно нанести тільки на субстрат (текстильний матеріал), а не на шкіру людини. Залежно від споживчої цінності субстрату обробка має бути більшою чи меншою мірою пов'язана з ним, але повинен бути чітко виражений її антибактеріальний ефект, що забезпечував би матеріалу необхідний захист [20, 21].

Протимікробні обробки дозволяють запобігти розмноженню бактерій. Вироби, оброблені такими агентами є екологічно чистими, позитивно впливають на захист здоров'я та профілактику захворювань людей. Для текстильних виробів широкого вжитку все частіше використовують антимікробні обробки .

Розрізняють промивний та непромивний види антимікробних обробок, які наведені на рис. 1.

До зазначених видів антимікробних обробок та спеціальних типів антимікробних обробок висуваються такі вимоги:

- безпечність у вигляді низької токсичності для споживача;
- протиалергійна або несподражняюча дія під час використання в усіх можливих концентраціях;
- негативно не впливати на властивості постільних виробів;
- бути сумісними до водних репелентів, антипіренів, барвників тощо з хімічними речовинами обробки текстилю;
- забезпечувати максимальний антимікробний ефект при мінімальній концентрації;
- бути недорогими та зручними у використанні.

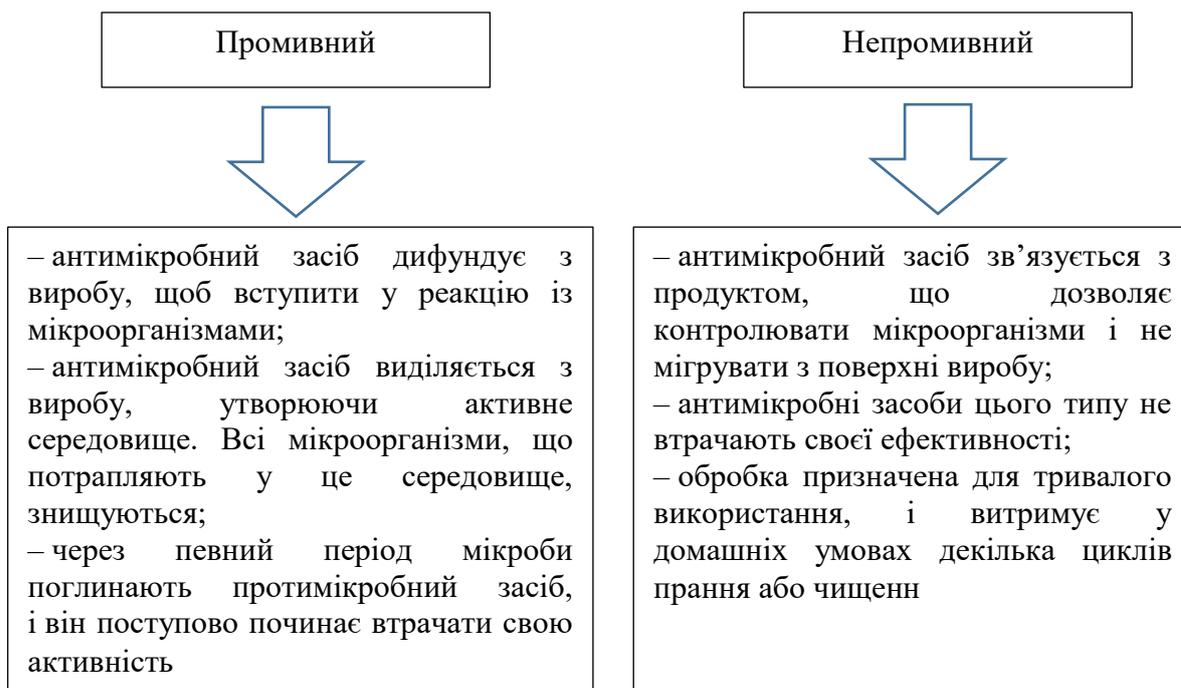


Рис. 1. Види антимікробних обробок

Дія живих організмів на промислову текстильну сировину, матеріали та вироби може суттєво змінити їх споживні властивості, погіршити якість, а в деяких випадках призвести до повної їх руйнації. Властивості сировини можуть змінюватися під час зберігання, експлуатації, іноді під час виробництва під дією різних факторів зносу, викликаючи таким чином відповідні їх пошкодження та дочасний знос, тому потрібні певні обробки, які усувають або зменшують дію мікроорганізмів на постільні вироби.

Отже, широке використання інноваційних екологічних та безпечних текстильних наповнювачів, розробка та застосування нових та вже відомих біоцидних препаратів для обробляння вихідних матеріалів, створення нових постільних виробів з об'ємними наповнювачами, що оброблені біоцидними препаратами, використання хімічно безпечних матеріалів та препаратів є перспективним напрямом покращення якості та безпечності зазначених вище постільних виробів.

В номенклатурі показників якості необхідно віднайти місце для біологічних властивостей постільних виробів з об'ємними наповнювачами. Тому номенклатуру показників та характеристик якості постільні вироби з об'ємними наповнювачами для сфери використання доцільно формувати з використанням теорії привабливої якості – моделі Кано (рис. 2) [24 – 28].

Відповідно до моделі задоволеність споживачів оцінюється за допомогою трьох груп властивостей, показників і відповідних характеристик – обов'язкових (або необхідних), очікуваних і захоплюючих.

До *обов'язкових показників* відносять кількісні ознаки наповнювачів та чохлаві постільних виробів з об'ємними наповнювачами, які характеризують вміст тих чи інших речовин (сполук, елементів), які

привнесені до волокнистого складу або структури виробу і не перевищують допустимі відповідними чинними документами норми. Ці речовини визначають безпечність готових виробів і не можуть перевищувати допустиму норму (важкі метали і їх сполуки, неметалічні елементи, смоли, наповнювачі, апрети тощо). До обов'язкових показників необхідно віднести і електризуємість виробів, яка може негативно впливати на самопочуття людини. Особливо ретельно цей перелік слід розробляти стосовно дитячих постільних виробів з об'ємними наповнювачами. Показники цієї категорії в стандарті повинні мати позначення: «не більше...» або «в межах...». Виконання вимог споживачів щодо обов'язкових показників майже не сприяють збільшенню споживчої цінності постільних виробів з об'ємними наповнювачами, а от їх невиконання – різко знижує.

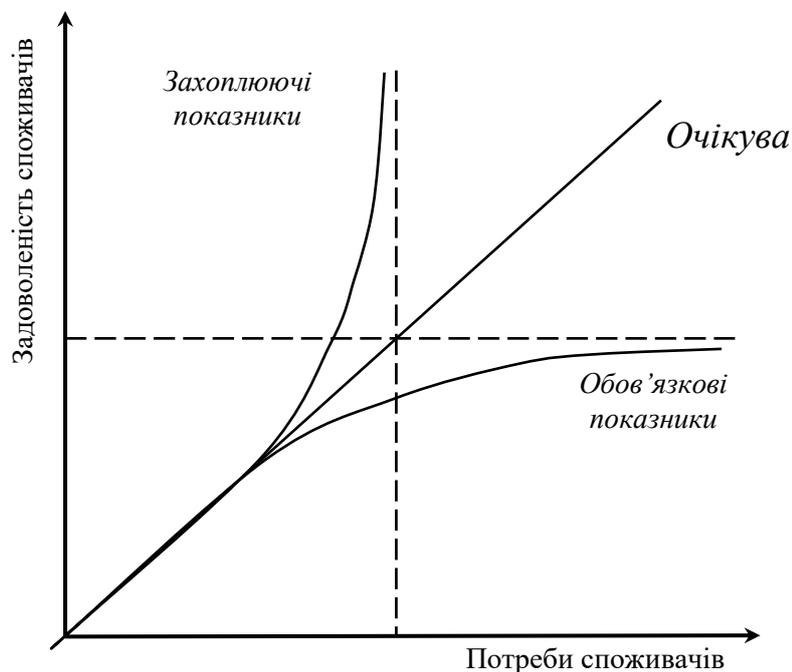


Рис. 2. Модель Канно

Очікувані показники властивостей постільних виробів з об'ємними наповнювачами можна поділити на три підгрупи: показники волокнистого складу і будови (структури) чохла та наповнювача; показники корисності у використанні споживачами за функціональним призначенням; показники естетичних властивостей. Показники першої підгрупи відомі як *нормативні*. Вони складають основу технічних умов на конкретні види постільних виробів з об'ємними наповнювачами – ковдри, подушки та на матрацники і формують базу нормативних стандартів.

Показники другої підгрупи являють собою кількісні ознаки утилітарних властивостей (від лат. *utilitas* – користь, вигода). Номенклатура цих показників є найбільш широкою і характеризує функціональні, ергономічні, надійнісні, екологічні властивості та безпечність постільних виробів з об'ємними наповнювачами. *Очікувані*

показники цієї підгрупи мають тенденцію до зростання. Вони віддзеркалюють досягнення науково – технічного прогресу в галузі та ступінь запровадження інновацій у виробництво постільних виробів з об'ємними наповнювачами. Ці показники, збільшуючи задоволеність споживачів, стимулюють зростання їхніх потреб і спонукають виробників вдосконалювати виробництво своєї продукції.

Показники властивостей третьої підгрупи характеризують стильову спрямованість, оригінальність і досконалість художнього оформлення постільних виробів з об'ємними наповнювачами. Слід зазначити, що в ДСТУ 3047 – 95 [28] та ДСТУ 3045 – 95 [29] наведені лише деякі показники цієї підгрупи, а саме: ступінь білості, ступінь стійкості фарбування, формостійкість (усадка), показники незмиральності. Визначення кількісних характеристик естетичних властивостей тканин є складною проблемою, а їх оцінювання потребує від експертів спеціальних знань.

Захоплюючі показники властивостей тканин носять переважно евристичний характер. Вони підвищують задоволеність споживачів. В стандартах показники цієї категорії, на наш погляд, можуть бути наведені у загальному переліку (антиалергічний ефект, біоцидна обробка тощо), оскільки споживач знайомиться з ними, як правило, на ринку або пізнає через рекламні засоби. Захоплюючі показники повинні мати відношення, насамперед, до постільних виробів з об'ємними наповнювачами оновленого асортименту, оскільки з часом вони трансформуються в очікувані, а інколи можуть стати обов'язковими, або необхідними, характеристиками продукції масового виробництва.

Отже, до обов'язкових властивостей відносяться показники безпечності, наприклад, вміст шкідливих речовин (формальдегіду, важких металів тощо), а характеристикою даного показника є кількість відповідної речовини. До очікуваних властивостей було віднесено властивості надійності, де показником є стійкість до загального руйнування чохла постільних виробів з об'ємними наповнювачами – міцність на розрив, її характеристиками – розривальне навантаження та подовження під час розриву і т.д.

До захоплюючих властивостей було віднесено біологічну безпечність та сприйняття запаху. Сьогодні існує проблема біопшкодження постільних виробів з об'ємними наповнювачами – ковдри, подушки, на матрацники, – оскільки ці вироби не підлягають багаторазовому пранню, а їх експлуатація відбувається при підвищеній відносній вологості та температурі повітря. Гігієнічною нормою для текстильних матеріалів є обробка біоцидними препаратами – вони гальмують процес старіння, підвищують зносостійкість [30].

Біоцидне оброблення доцільно використовувати для захисту постільних виробів з об'ємними наповнювачами від біологічного руйнування. При цьому біоцидна речовина може бути однорідною або сумішшю речовин, призначеною для знищення шкідливих організмів, в тому числі мікроорганізмів. Якість біоцидної обробки визначається не

тільки ефективністю її фіксації на текстильному матеріалі, але і безпечністю для людини і навколишнього середовища. Безпечність біоцидів, що застосовуються для обробки вихідної сировини, визначаються Європейською Директивою з біоцидних продуктів (European Biocidal Products Directive 98/8/EC).

В інтернет огляді для виробів з біоцидною обробкою Шведського агентства хімічних речовин (Swedish Chemicals Agency), біоцидна обробка використовується у багатьох виробках щоденного вжитку, зокрема: спортивний одяг, нижня білизна, головні убори, рукавички, шкарпетки, матраци, чохли для матраців, подушки, постільна білизна, рушники, килимки, меблі, штори, тканинні настінні покриття. Очікується, що світовий ринок біоцидів досягне 13,9 млрд дол США до 2025 р. в порівнянні з 9,1 млрд дол США в 2017 р., маючи сукупний щорічний темп зростання в середньому 7,0 % у прогнозованому періоді з 2018 по 2025 рр. [31].

Про актуальність і значну увагу до виробів з біоцидною обробкою свідчить той факт, що різні країни світу регламентують як біоцидні засоби так і розміщення на ринку виробів з біоцидною обробкою, або вимагають, щоб на ринок визначені товари надходили тільки попередньо оброблені біоцидними препаратами.

На сьогодні Європейське агентство хімічних продуктів в Гельсінкі (The European Chemical Agency in Helsinki (ECHA)) та Комісія ЄС інформують про активні речовини та біоциди, які були схвалені та дозволені, а також наводить їх класифікацію та властивості [32].

В країнах європейського союзу діють правила, що регулюють біоцидні продукти і виробы, оброблені біоцидами. Ці правила затверджені Регламентом ЄС щодо біоцидних продуктів, який набув чинності у 2013 році [33].

Будь – яка особа, що імпортує оброблені біоцидами товари в ЄС, або виробляє цю продукцію в межах ЄС, несе відповідальність за безпеку для здоров'я людини або навколишнього середовища, правильне маркування. Оброблений біоцидними препаратами товар може бути розміщений на ринку при умові, що такі препарати дозволені в країнах ЄС, або включені у відповідну програму огляду активних речовин [34].

Відповідно до вимог Кодексу федеральних правил США [35] подушки (код HS 940490 – *Articles of bedding/furnishing, nes, stuffed or internally fitted*), які ввозяться до США з усіх країн світу мають піддаватися тепловій обробці (нетарифний захід – холодна/гаряча обробка за кодом А 51 – Cold/heat treatment (NTM code – A51)). Крім того, необхідна обробка метилбромідом (methyl bromide treatment) (нетарифний захід – фумігація за кодом А 53 – 1 – Fumigation (NTM code – A53)).

Основні класи протимікробних речовин для текстилю включають орґано – металік, феноли, солі четвертинного амонію і орґано – силікони. Біс – феноли, є класом сполук, що мають широкий спектр протимікробної активності. Два найбільш широко використовуваними членами цієї групи є триклозан (2,4,4' – трихлор – 2' – гідроксидифеніловий ефір) і

гексахлорофен. Через проблеми токсичності, використання гексахлорофену в продукції було обмежено. У концентраціях 0,2 – 2% триклозан діє як біоцид, за нижчих концентрацій пригнічує синтез жирних кислот мікроорганізмів.

Триклозан ($C_{12}H_7Cl_3O_2$) – це порошок у вигляді білих кристалів, що не розчиняється у воді, але добре розчинний у лугах, органічних розчинниках та оліях. Триклозан стійкий до дії окислювачів та повільно розкладається під дією ультрафіолетового випромінення, він має виражений антибактеріальний та фунгіцидний ефект широкого спектру.

Необхідно відмітити, що триклозан не зареєстрований в Державному реєстрі небезпечних факторів та речовин Комітету з питань гігієнічного регламентування Міністерства охорони здоров'я України [36].

Дія триклозану головним чином полягає у пригніченні біосинтезу жирних кислот шляхом блокування біосинтезу ліпідів та синтезу ліпопротеїдів, що пов'язано з пригніченням активності ферменту білку – носію редуктази (ENR), які необхідні для побудови мембран і, відповідно, репродукції бактерій. Принцип дії триклозану полягає в тому, що ця речовина зв'язується з бактеріальним ферментом ENR (еноїлрелактазою), при цьому відбувається конформаційна зміна активного центру ферменту з утворенням стабільного комплексу ENR – NAD⁺. У людини фермент ENR відсутній, тому триклозан не чинить їй шкоди [37, 38].

Нами був розроблений біоцидний препарат «Бактрим» на основі триклозану, яким обробляли наповнювачі для постільних виробів [39]. Біоцидний препарат «Бактрим», який розроблений на основі триклозану є одним із препаратів, який має високу бактерицидну активність і може бути використаний для цієї мети у текстильній промисловості.

Аналізуючи різні мікробіологічні пошкодження текстильних матеріалів та виробів з них визначено, що домінуюче місце мають мікроскопічні міцеліальні (цвільові) гриби з різними морфологічними, фізіологічними і генетичними особливостями. Вони мають високу здатність до адаптації в умовах навколишнього середовища. Завдяки активному спороутворенню вони володіють можливістю широкого поширення та тривалого збереження життєздатності. Такі мікроскопічні міцеліальні (цвільові) гриби можуть колонізувати нові текстильні матеріали та екологічні ніші. До них відносять цвільові гриби роду *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Alternaria*, *Paecilomyces*, *Fusarium* та інші які є найбільш поширеними у навколишньому середовищі. У певних екологічних нішах живої природи такі міцеліальні гриби виконують корисну роль і є продуцентами ферментів та біологічно активних речовин. Поряд із цим вони мають потужну руйнівну силу і спричиняють біодеструкції будівель, виробів та матеріалів, викликають захворювання рослин, тварин та людини [40].

Важливим для визначення кожного з вищезазначених видів міцеліальних грибів є аналіз їх особливостей. Так *Aspergillus* (аспергелліус) походить з роду вищих аеробних цвілевих грибів, що

включає в себе кілька сотень видів. Забарвлення його колоній знаходиться у кольоровій гамі широкого діапазону – від білого до чорного. Гриби цього роду швидко ростуть, мають одноклітинні нерозгалужені конідієносці. Верхівки конідієносців несуть на своїй поверхні в один або два ряди стеригми з ланцюжком конідій. Конідії мають круглу форму зафарбовану в жовтий, зелений, коричневий чи інший колір.

Гриби *Penicillium* (пеніциліум) відносять до родини Aspergillaceae. Їх колонії характеризуються повзучим ростом, мають оксамитову поверхню. Вони мають вегетативний жовто – кремовий міцелій, конідіальна зона жовто – зелена та синьо – сіро – зелена. Верхня частина конідієносця має вигляд кісточки різної складності, а стеригми у колотівці, конідії еліптичні, заокруглені та кулясті.

До роду аскоміцетових грибів входять *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Raecilomyces* та *Fusarium*. Так *Trichoderma* (тріходерма або телеоморфа) утворює коричневу строму її конідієносці сильно розгалужені. Конідії мають блідо – зелений або зелений колір, вони більш активно утворюються в центральній частині колонії яйцевидної форми.

Молоді колонії грибів *chaetomium globosum* (хетомій шаровідний) з ніжним, світлим повітряним з віком змінюють колір на лимонно – зелений, жовтий, зеленувато – оливковий або сіро – оливковий. Їх плодові тіла (перитеції) мають кулясту або яйцеподібну форму. Аски цих грибів веретеновидні або булавовидні і мають 8 сплюснених аскоспор.

Колонії грибів *raecilomyces* (пеціломіцес) є порошисті, іноді пучкуваті і в масі мають жовто – коричневий колір. Їх конідієносці неправильно розгалужені, з мутовчато розташованими гілочками, що закінчуються пучком з 2 – 7 циліндричних (еліпсоїдальних) фіалід. Конідії цих видів грибів переважно еліпсоїдальні, часто з усіченими кінцями і утворюють хламідоспори.

Міцелій у різних видів грибів *fusarium* (фузаріум) може бути різноманітного забарвлення: білий, рожевий, бузковий або бурий. Зазвичай колонії цього виду грибів мають мікро – і макроконідії. Макроконідії є фрагмоспорами і складаються з декількох клітин. Мікроконідії найчастіше одноклітинні формують ланцюжки, або зібрані в головки і можуть утворювати скупчення між гіфами. Характерною для фузаріїв є властивість до утворення спорходів, подушкоподібного плетива гіфів, вкритого конідієносцями.

Гриби *alternaria* (альтернарія) відносяться до класу дотідеомицетів. Вони утворюють широкорослі, темнозабарвлені колонії сірих, коричнево – чорних або чорнуватих тонів. Міцелій в них септований, а конідієносці прості, розгалужені, поодинокі або в пучках і мають коричневий колір. Конідії у цих грибах поодинокі або в ланцюжках, іноді розгалужені, яйцеподібні до циліндричних, а у верхній частині у багатьох видів витягнуті в шийку [5].

Більшість мікроскопічних міцеліальних грибів, в тому числі: *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Trichoderma spp.*, *Chaetomium spp.*,

Alternaria spp., *Paecilomyces spp.*, *Fusarium spp.*, *Candida spp.* є умовно – патогенними. Їх патогенність невелика і мікози розвиваються зазвичай за наявності сприяючих чинників, часто мають професійний характер, а також на тлі імунодефіцитних станів. За назвою збудника, який став причиною захворювання, їх називають аспергільозами, пеніцилінозами, мукорозами, кандидозами та ін. Це так звані опортуністичні мікози, які виникають у імунокомпроментованих осіб (ВІЛ – інфіковані і хворі СНІДОМ, при інтенсивній цитостатичній і тривалій кортикостероїдній терапії у онкологічних та онкогематологічних хворих, при аутоімунних та інших захворюваннях).

При постійному контакті з міксоміцетами, у людей з порушеннями в системі імунітету, виникає сенсibiliзація з розвитком патофізіологічних алергічних реакцій. Найчастіше контакт з алергенами грибів може призвести до розвитку бронхіальної астми, екзогенних алергічних альвеолітів, тому чистота жилих приміщень, предметів побуту від грибкової колонізації є вкрай необхідною умовою для збереження здоров'я населення.

Враховуючи зазначене вище важливою та актуальною проблемою є робота над розробкою нових текстильних матеріалів з антимікробними властивостями, а також біоцидних засобів, які унеможливають ріст і розмноження мікроорганізмів, бактерій та грибів захищаючи споживачів від їх негативного впливу, а матеріали та предмети побутового вжитку від біологічної деструкції.

Важливим є дослідження мікробіологічного забруднення наповнювачів постільних виробів без обробки та попередньо оброблених біоцидним препаратом «Бактрим» і проведення оцінки його біоцидної активності, які проводилися в Львівському національному медичному університеті ім. Данила Галицького.

З вище зазначеною метою нами були згруповані наповнювачі для постільних виробів за сировинним складом. Так до групи натуральних білкових волокон було віднесено пухо – перові наповнювачі, наповнювачі з вовни овечої, верблюжої, кашемірової та волокон натурального шовку. Наповнювачі з бавовняного, бамбукового, евкаліптового волокон були згруповані в групу целюлозовмісних наповнювачів. Окрему групу становили наповнювачі з синтетичних волокон (поліестер).

Споживачі надають перевагу постільним виробам з вовняним наповнювачем. Тому важливим є дослідження мікробіологічного забруднення саме постільних виробів з вовняним об'ємним наповнювачем. З групи целюлозовмісних текстильних наповнювачів для дослідження мікробіологічного забруднення було обрано евкаліптове волокно, оскільки його використання в якості наповнювача є прогресивним. Третім зразком було волокно поліестеру, яке відноситься до класу хімічних синтетичних волокон.

Для дослідження нами були обрані найбільш поширені в екосистемі «людина – навколишнє середовище» та швидкоростучі у лабораторних умовах (при інфікуванні матеріалів проростають через 15 – 60 днів)

мікроскопічні гриби. На видовий склад таких грибів – чисельність, поширеність та інтенсивність пошкодження ними субстрату, безпосередній вплив мають багаточисельні фактори навколишнього середовища. В умовах спонтанного зараження ріст грибів констатують – через 1,5 – 3 роки.

Оцінювання текстильних наповнювачів здійснювали за бальною шкалою на 28 день експерименту. Зразки рахували грибостійкими при оцінці від 0 до 3 балів. Оцінку біоцидної дії «Бактриму» проводили методом мікроскопії нативних волокон наповнювача при збільшенні 10x40. Мікроскопічна оцінка зразка була необхідна для констатації факту щодо відсутності проростання спор, конідій та присвоєння біоциду бальної оцінки «0», яка давала підставу рахувати його придатним для захисту тканин і виробів від грибової корозії.

Контролем служили зразки наповнювачів без інокульованої тестової культури. Контроль, зразки 1, зразки 2 інкубували при температурі 29°C, вологості 85 – 90 % протягом 28 днів. Візуальну оцінку тестових поверхонь проводили на 7, 14, 21, 28 день інкубації. Життєздатність робочих суспензій тестових штамів грибів перевіряли шляхом їх інокуляції на селективне середовище Чапека – Докса (або Сабуро) з подальшою інкубацією культури при температурі 29°C, вологості 85 – 90 % до моменту отримання росту.

Початковим етапом дослідження було встановлення можливих мікробіологічних пошкоджень волокон вовни, які відбувалися зі зразками не інокульованими спорами грибів в умовах підвищених температур (29°C) та вологості 85 – 90 %. На рис. 3.3 візуально можна спостерігати за змінами зовнішнього вигляду текстильних наповнювачів до тестової культури, на прикладі *Aspergillus terreus*.



Рис. 3. Грибостійкість ковдр з різним типом наповнювача до тестової культури *Aspergillus terreus*: верхній ряд – вовна овеча, середній – волокна евкаліпту, нижній ряд – поліестер

Оцінювали грибостійкість текстильних наповнювачів за бальною шкалою:

0 – під мікроскопом проростання спор і конідій не виявлено;

1 – під мікроскопом наявні пророслі спори і незначно розвинений міцелій;

2 – під мікроскопом видно розвинений міцелій, можливе спороношення;

3 – неозброєним оком ледь вловлюється міцелій і (або) спороношення, проте добре візуалізуються під мікроскопом;

4 – неозброєним оком добре видно ріст грибів, які покривають менше 25 % поверхні досліджуваного зразка;

5 – неозброєним оком добре видно ріст грибів, які покривають понад 25 % поверхні досліджуваного зразка.

Оскільки за своїм хімічним складом вовняні волокна відносяться до білкових або протейінових речовин, то основною речовиною яких є кератин – складне білкове з'єднання, що відрізняється від інших білків значним вмістом сірки. Кератин утворюється під час біосинтезу амінокислот в клітинах епідермісу волосяної сумки в шкірі тварин. Різний вміст амінокислот у вовняних волокнах різних видів тварин обумовлює їх особливості. За будовою кератин являє собою складний комплекс, що містить пучки високомолекулярних ланцюгів, що взаємодіють як в поздовжньому, так і поперечному напрямках [1].

Велике значення має кількість цистину (амінокислоти), що містить сірку, адже вміст сірки позитивно впливає на технологічні та фізико – механічні властивості вовняного волокна, на стійкість до хімічних впливів та його еластичність. Реакційна здатність кератину вовняного волокна визначається будовою головних поліпептидних ланцюгів, природою бічних радикалів, наявністю поперечних зв'язків. З усієї кількості амінокислот тільки цистин утворює поперечні зв'язки, а їх наявність у значній мірі визначає нерозчинність вовняного волокна у багатьох реагентах [41]. Руйнування цистинових зв'язків сприяє ушкодженню вовняних волокон сонячним світлом, окислювачами та іншими агентами.

Враховуючи зазначене вище білок кератин – може бути живильним середовищем для розвитку мікроорганізмів.

Кінетика руйнування вовни під дією мікроорганізмів протікає в кілька стадій: спочатку вони руйнують лусковий шар волокна, а потім проникають у корковий його шар, при цьому сам корковий шар не руйнується, а є для мікроорганізмів живильним середовищем. В результаті цього порушується структура волокна – лусочки і клітини коркового шару втрачають зв'язки між собою, волокна розтріскуються і розпадаються.

Гриби, використовуючи жир, шкірні виділення, створюють умови для подальшої життєдіяльності бактерій – руйнівників. Роль мікроскопічних грибів може зводитись до розщеплення верхівок волокон. Таке розщеплення дозволяє проникати всередину волокна бактеріям.

Пошкодження вовняних волокон згруповують до узагальнюючих видів, обумовлених особливостями їх структури [41]:

- плямистість і обростання – скупчення бактерій або грибів та продуктів їх життєдіяльності на поверхні волокна;
- пошкодження лускового шару, місцеве і поширене;
- розшарування коркового шару до веретеноподібних клітин;
- розпад веретеноподібних клітин.

В Інституті хімії поверхні ім. О.О. Чуйко НАН України проводили дослідження структури і поверхневих змін у наповнювачах, які відбувалися внаслідок грибової інвазії використовуючи скануючий електронний мікроскоп (SEM) MIRA3 LMU, Tescan з роздільною здатністю ± 1 нм, де попередньо на зразки наносили шар золота. Принцип SEM базується на скануванні поверхні матеріалів точно сфокусованим пучком електронів циліндричної форми (електронний зонд з діаметром пучка < 10 нм), який сканує зразок по рядках (точка за точкою) і синхронно передає сигнал на кінескоп. У проведених нами дослідженнях поверхню зразків волокнистих матеріалів, покриту шаром золота (Au) досліджували за допомогою скануючого електронного мікроскопа «SEM HITACHI S800» (Японія). Напруга на катоді становила 15 кВ, збільшення зображення варіювали від 15 до 50 000 разів. Відстань від пробки до катода становила 50 мм, вакуум в камері $\sim 0,05$ мілібар, час нанесення ~ 100 с використовуючи комп'ютерну програму Origin 7.0, отримані мікрофотографії SEM були трансформовані в піксельні матриці з роздільною здатністю 1024x768 пікселів.

Результати досліджень отриманих за допомогою скануючого електронного мікроскопа MIRA3 LMU представлено на рис. 4.

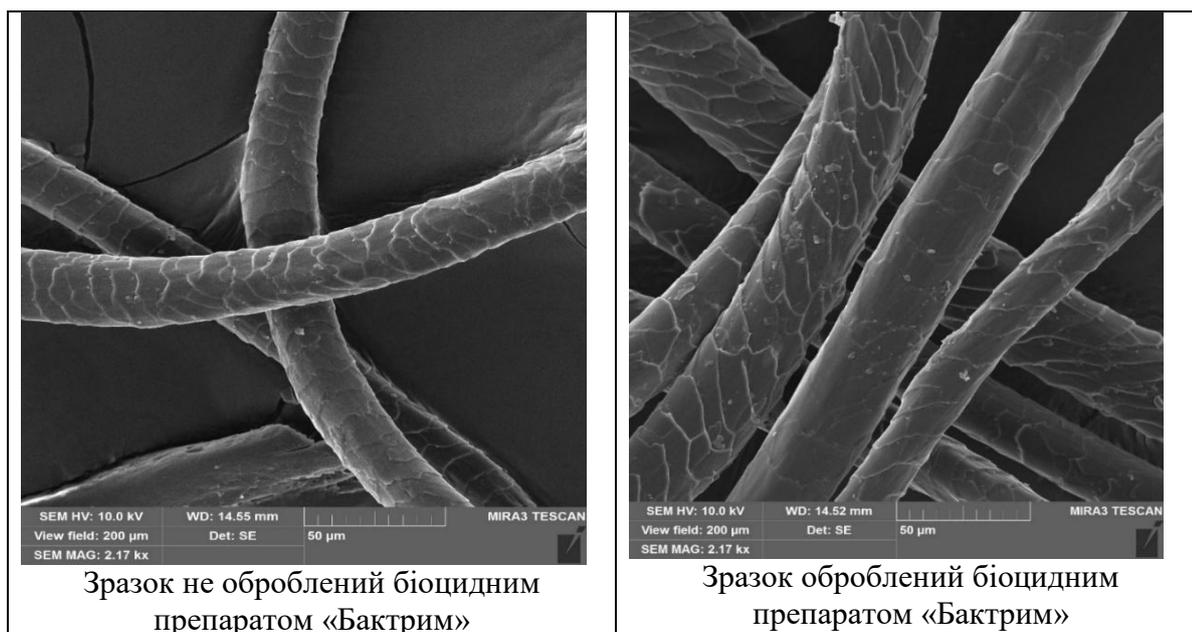


Рис. 4. SEM зображення волокна наповнювача з вовни овечої, не інокульованих спорами грибів

Встановлено, що в умовах підвищених температур та вологості на 28 день тестування на зразках з наповнювачем з волокон вовни овечої, що не оброблена біоцидним препаратом та оброблених біоцидним препаратом «Бактрим» не виявляли видимих ознак біологічного пошкодження: зміни кольору, появи колоніального росту мікроорганізмів, що вказувало на ступінь чистоти зразків, належні умови зберігання та відсутність спонтанного грибкового інфікування.

На рис. 5 та 6 представлено зовнішній вигляд волокон наповнювача з вовни овечої не оброблених біоцидним препаратом «Бактрим», але інокульованих *Aspergillus niger* та *Aspergillus terreus* на 14 та 28 день тестування.



Рис. 5. СЕМ зображення волокна з вовни овечої не оброблені біоцидним препаратом «Бактрим» та інокульовані *Aspergillus niger*

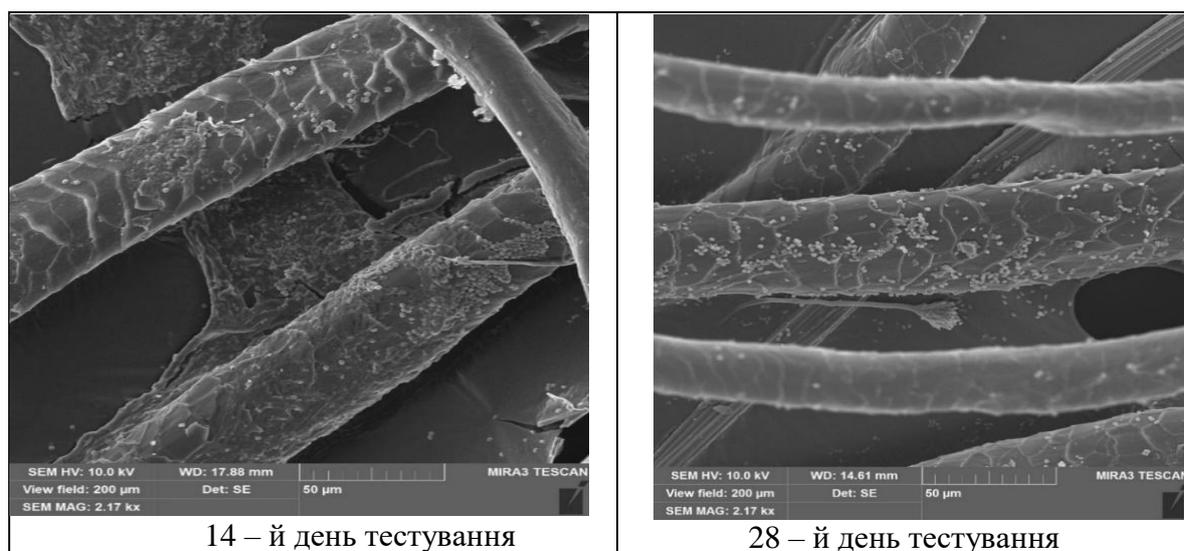


Рис. 6. СЕМ зображення волокна наповнювача з вовни овечої не оброблені біоцидним препаратом «Бактрим» та інокульовані *Aspergillus terreus*

Активність мікозної колонізації була вищою для штамів *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Paecilomyces variotti* з ознаками росту культури, який спостерігали вже на 21 – й день експерименту. Видимий ріст грибів роду *Chaetomium globosum*, *Penicillium funiculosum*, *Trichoderma viride* відзначено на 28 – й день інкубації. Результати дослідження на грибостійкість наведено в табл. 1.

Таблиця 1. Грибостійкість наповнювачів з вовни овечої для постільних виробів

| Види грибів | Зразок не оброблений біоцидним препаратом «Бактрим» | Зразок оброблений біоцидним препаратом «Бактрим» |
|---|---|--|
| <i>Aspergillus niger</i> F – 16693 | 4+ | 0 – 2+ |
| <i>Aspergillus terreus</i> F – 8472 | 3+ | 0 – 2+ |
| <i>Penicillium funiculosum</i> F – 100039 | 3+ | 0 – 2+ |
| <i>Trichoderma viride</i> F – 100021 | 3+ | 0 – 2+ |
| <i>Chaetomium globosum</i> F – 405 | 3+ | 0 – 2+ |
| <i>Paecilomyces variotti</i> F – 424 | 3+ | 0 – 2+ |

Примітка: візуальну оцінку росту грибів проводили за допомогою лупи із збільш. ×4

Слід відзначити, що найвища активність до субстрату (вовняні волокна) наявна у *Aspergillus niger* з бальною оцінкою «4+». Ріст інших грибів оцінено на «3+».

На зірцях зразка, попередньо обробленого біоцидним препаратом «Бактрим», упродовж регламентованого терміну проведення експерименту видимих ознак росту грибів не виявлено й відповідно цей зразок за бальною шкалою грибостійкості було оцінено за бальною шкалою грибостійкості від 0 до 2+ й класифіковано як грибостійкий.

Зображення поверхні інфікованих *Aspergillus niger* та *Aspergillus terreus* волокон вовни овечої обробленої препаратом «Бактрим» показують, що біоцидний захист пригнічує ростову здатність гриба (рис. 7, 8).

На 14 день культивування фіксується лише поодинокі проростання спор з формуванням міцелію, на 28 день – утворення конідій. Така картина відповідає оцінці грибостійкості «2+» і є співставними з результатами досліджень поданих у табл. 1.

Отже, текстильні наповнювачі з волокон вовни овечої попередньо оброблених біоцидним препаратом «Бактрим» можна вважати грибостійким до музейних штамів грибів: *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium funiculosum*, *Chaetomium globosum*, *Paecilomyces variotti*, *Trichoderma viride*. Незахищені біоцидом текстильні волокна, що використані як наповнювач для постільних виробів для сну дають видимий ріст досліджуваних штамів грибів на 21 – 28 день інкубації та є найбільш чутливими до мікозної корозії обумовленої *Aspergillus niger*.

Для встановлення можливих біологічних пошкоджень евкаліптових волокон, які відбувалися зі зразками не інокульованими спорами грибів в

умовах підвищених температур та вологості. На рис. 9. представлено СЕМ – зображення евкаліптових волокон, які не інокульовані спорами грибів.

Результати експериментальних досліджень зразків евкаліптових наповнювачів для постільних виробів, інфікованих грибами, наведені в табл. 2.

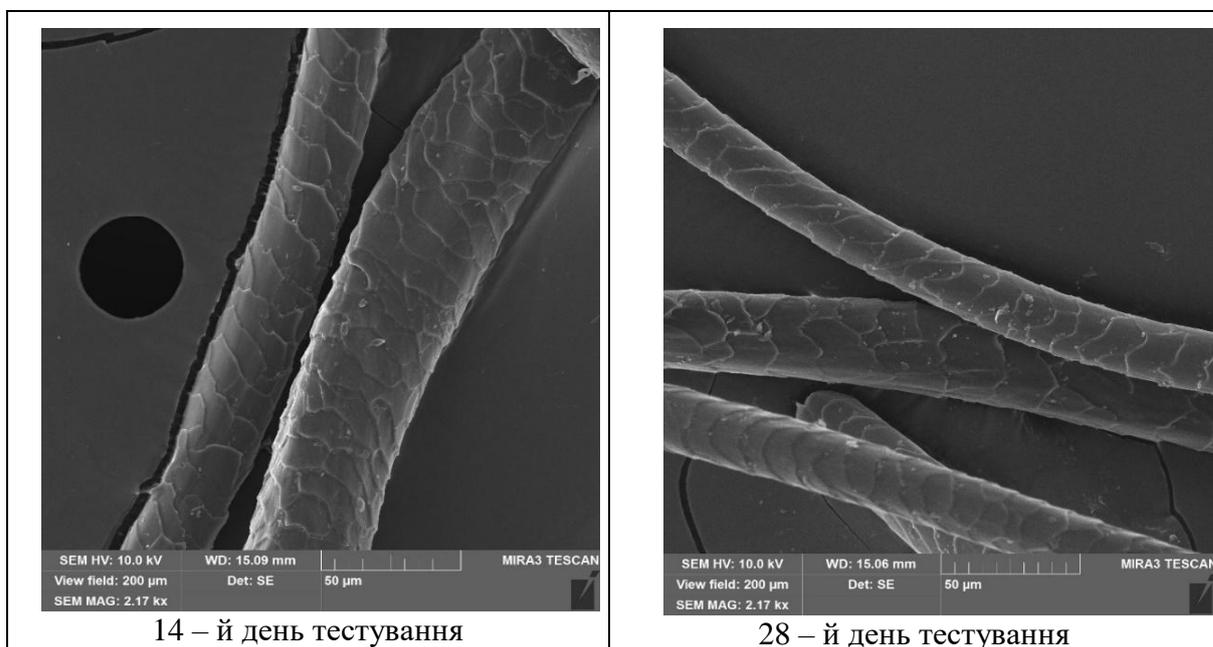


Рис. 7. СЕМ зображення волокна наповнювача з вовни овечої оброблені біоцидним препаратом «Бактрим» та інокульовані *Aspergillus niger*

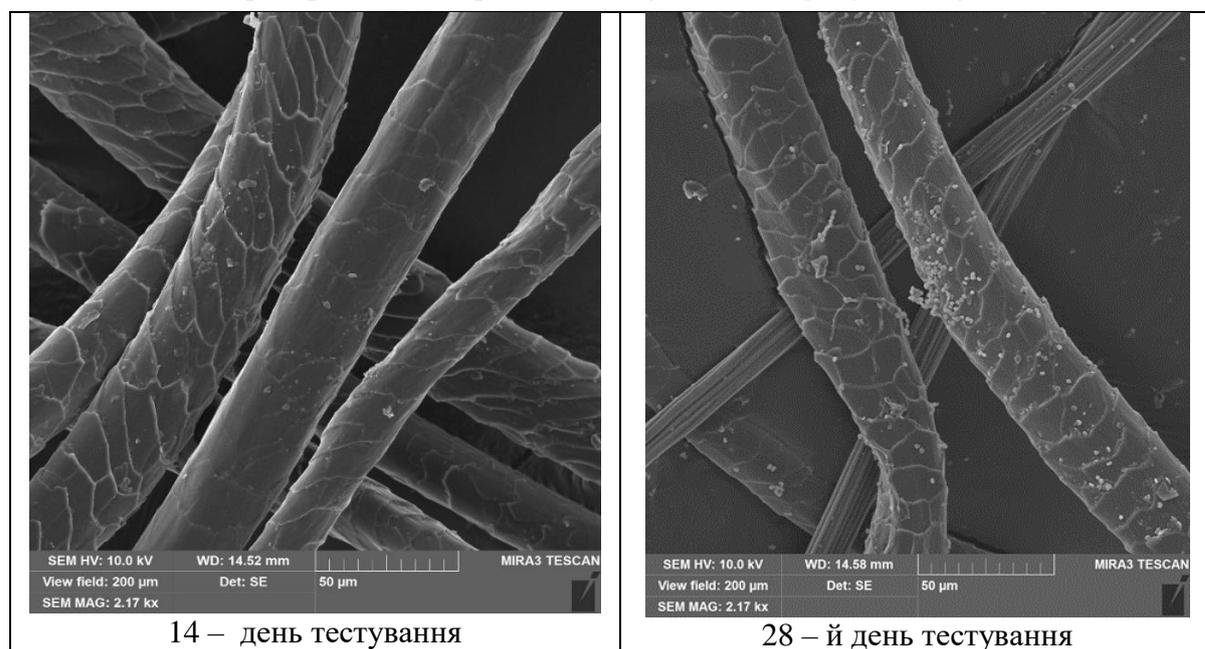


Рис. 8. СЕМ зображення волокна наповнювача з вовни овечої оброблені біоцидним препаратом «Бактрим» та інокульовані *Aspergillus terreus*

Встановлено, що зразок без біоцидного захисту добре піддавався біокорозії. Активність мікозної колонізації була вищою для штамів грибів *Aspergillus niger* (4+), *Trichoderma viride* (5+) з ознаками росту культури, який спостерігався вже на 14 день експерименту. Видимий ріст грибів роду

Aspergillus terreus, *Penicillium funiculosum*, *Paecilomyces variotti* відзначено на 21 день інкубації, а гриби роду *Chaetomium globosum* – на 28 день.

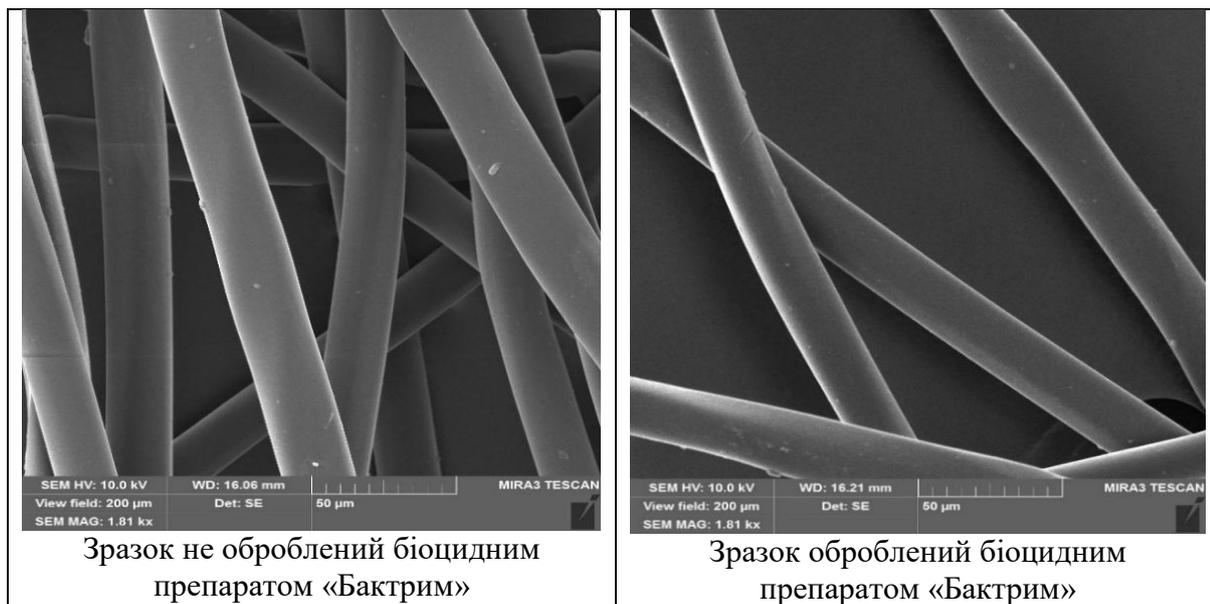


Рис. 9. СЕМ – зображення наповнювача з евкالیптового волокна, не інокульованих спорами грибів

Таблиця 2. Грибостійкість наповнювачів з евкالیптових волокон для постільних виробів

| Види грибів | Зразок не оброблений біоцидним препаратом «Бактрим» | Зразок оброблений біоцидним препаратом «Бактрим» |
|---|---|--|
| <i>Aspergillus niger</i> F – 16693 | 4+ | 0 – 2+ |
| <i>Aspergillus terreus</i> F – 8472 | 3+ | 0 – 2+ |
| <i>Penicillium funiculosum</i> F – 100039 | 3+ | 0 – 2+ |
| <i>Trichoderma viride</i> F – 100021 | 5+ | 0 – 2+ |
| <i>Chaetomium globosum</i> F – 405 | 3+ | 0 – 2+ |
| <i>Paecilomyces variotti</i> F – 424 | 3+ | 0 – 2+ |

Оскільки найагресивнішими виявилися гриби роду *Trichoderma viride* (5+), тому вважали за доцільне представити СЕМ – зображення саме цих експериментальних досліджень на 14 – й та 28 – й день тестування (рис. 10).

Видимий ріст грибів роду *Aspergillus terreus* на 14 – й та 28 – й день тестування на евкالیптовому волокні спостерігаємо на рис. 11.

Візуальну оцінку грибостійкості евкالیптового наповнювача для постільних виробів з об'ємними наповнювачами давали за показником взірця з максимальним балом. На зразку, попередньо обробленого біоцидним препаратом «Бактрим», упродовж регламентованого часу проведення експериментальних досліджень видимих ознак росту грибів не виявлено й відповідно цей зразок за баловою шкалою оцінено від 0 до 2+ і класифіковано як грибостійкий. Зображення поверхні наповнювачів з евкالیптових волокон постільних виробів, оброблених біоцидним препаратом «Бактрим» та інфікованих грибами роду *Trichoderma viride* представлені на рис. 12.

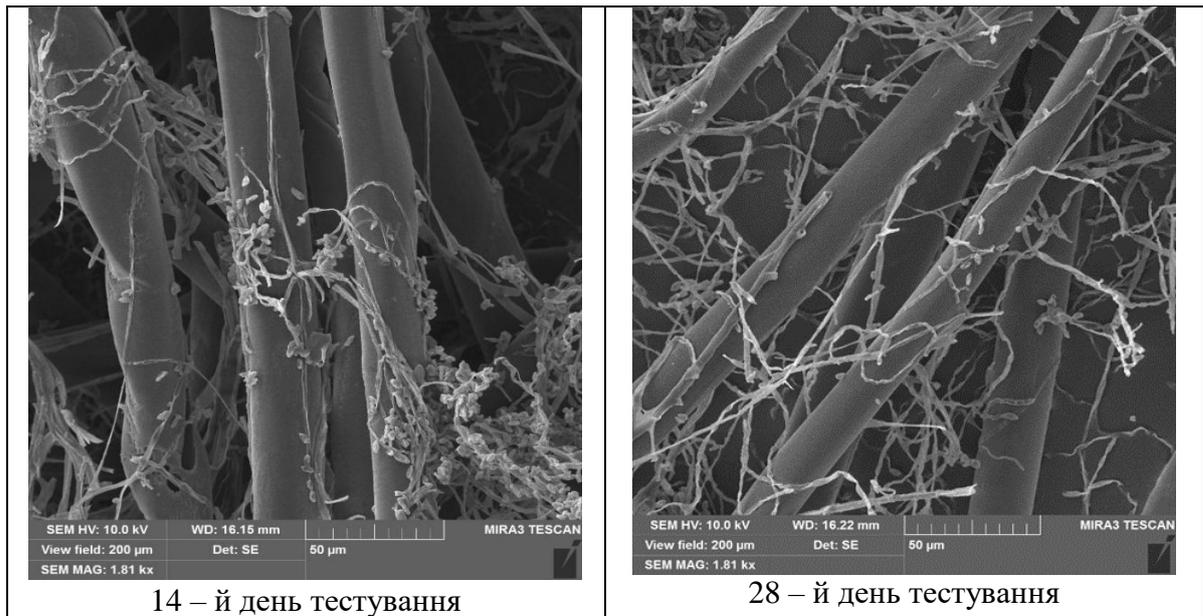


Рис. 10. СЕМ – зображення евкалиптового волокна не обробленого біоцидним препаратом «Бактрим» та інкульованого *Tricoderma viride*

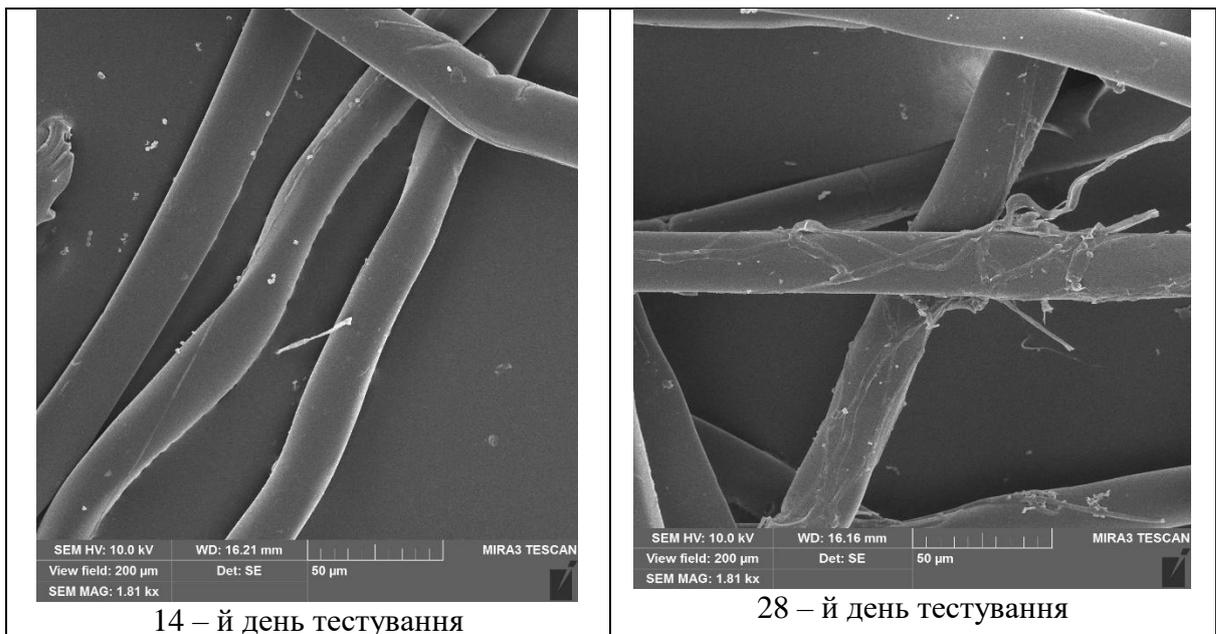


Рис. 11. СЕМ – зображення евкалиптового волокна не обробленого біоцидним препаратом «Бактрим» та інкульованого *Aspergillus terreus*

Зображення поверхні наповнювачів з евкалиптових волокон постільних виробів, оброблених біоцидним препаратом «Бактрим» та інфікованих грибами роду *Tricoderma viride* показують, що біоцидний захист пригнічує ростову здатність гриба.

Під час проведення експериментальних досліджень при оптимальних умовах культивування спори гриба фіксували в неактивному стані і на 28 день тестування. Зображення поверхні наповнювачів з евкалиптових волокон постільних виробів, оброблених біоцидним препаратом «Бактрим» та інфікованих грибами роду *Aspergillus terreuse* представлені на рис. 13.

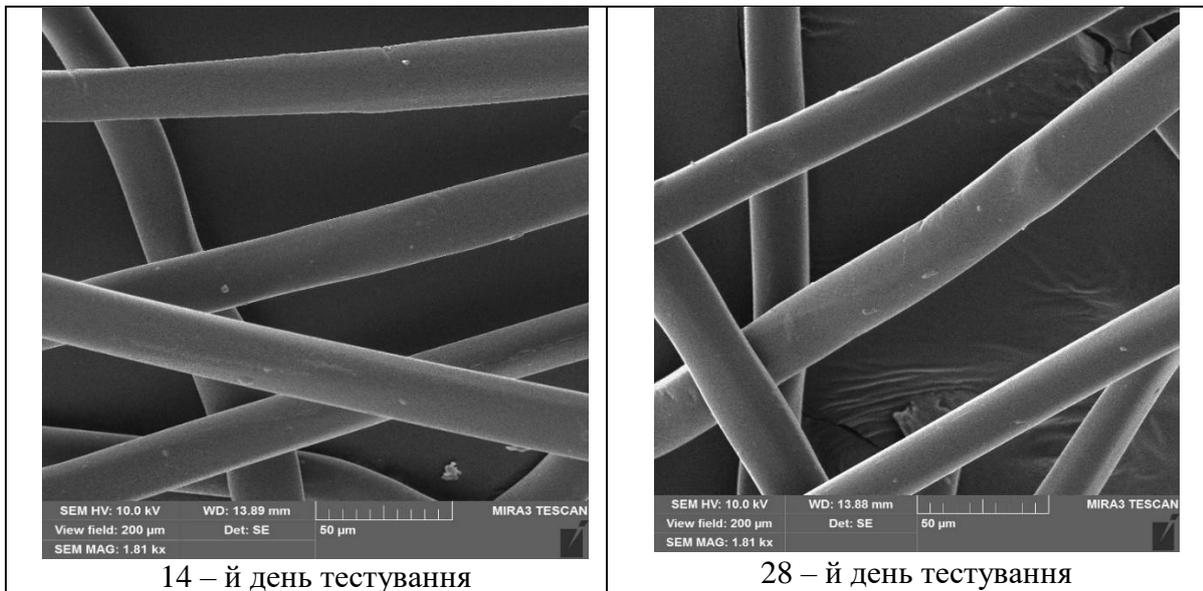


Рис. 12. СЕМ – зображення евкالیптового волокна обробленого біоцидним препаратом «Бактрим» та інокульованого *Trichoderma viride*

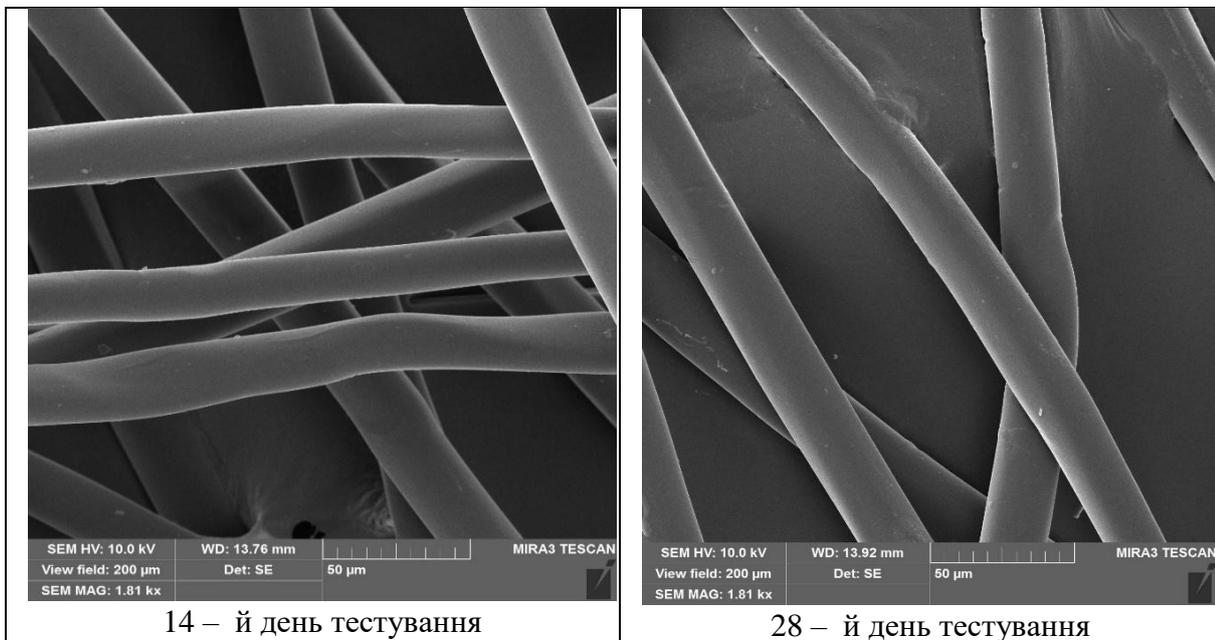


Рис. 13. СЕМ – зображення евкالیптового волокна обробленого біоцидним препаратом «Бактрим» та інокульованого *Aspergillus terreuse*

Встановлено, що текстильні наповнювачі з евкالیптових волокон без захисного покриття в умовах підвищеної вологості та оптимальних температур добре піддаються біокорозії викликаній штамами грибів: *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium funiculosum*, *Trichoderma viride*, *Chaetomium globosum*, *Paecilomyces variotti*. Активність мікозної колонізації найвища для грибів роду *Aspergillus niger* (4+), *Trichoderma viride* (5+) з видимими ознаками росту культури на 14 день експерименту. Візуалізацію росту грибів роду *Aspergillus terreus*, *Penicillium funiculosum*, *Paecilomyces variotti* відзначено на 21 день інкубації, а гриби роду *Chaetomium globosum* – на 28 день.

На зразках попередньо оброблених біоцидним препаратом «Бактрим», упродовж регламентованого часу проведення експериментальних досліджень, видимих ознак росту грибів не виявлено й за бальною шкалою оцінено від 0 до 2+ та класифіковано їх як «грибостійкі». Оскільки синтетичні волокна за структурою принципово відрізняються від натуральних та штучних, вони пошкоджуються мікроорганізмами значно менше. Серед мікроорганізмів, які руйнують синтетичні волокна, ідентифіковані гриби роду *Trichoderma*, які на початкових стадіях розвиваються за рахунок замаслювачів та апретів, не пошкоджуючи самі волокна. Згодом опутують їх міцелієм, розрихлюють їх і тим самим призводять до руйнування. На рис. 14 зображено фото зразків синтетичних наповнювачів для постільних виробів, що інокульовані спорами грибів *Trichoderma* на 28 день тестування оброблені препаратом «Бактрим» (а) та не оброблені даним біоцидним препаратом (б).

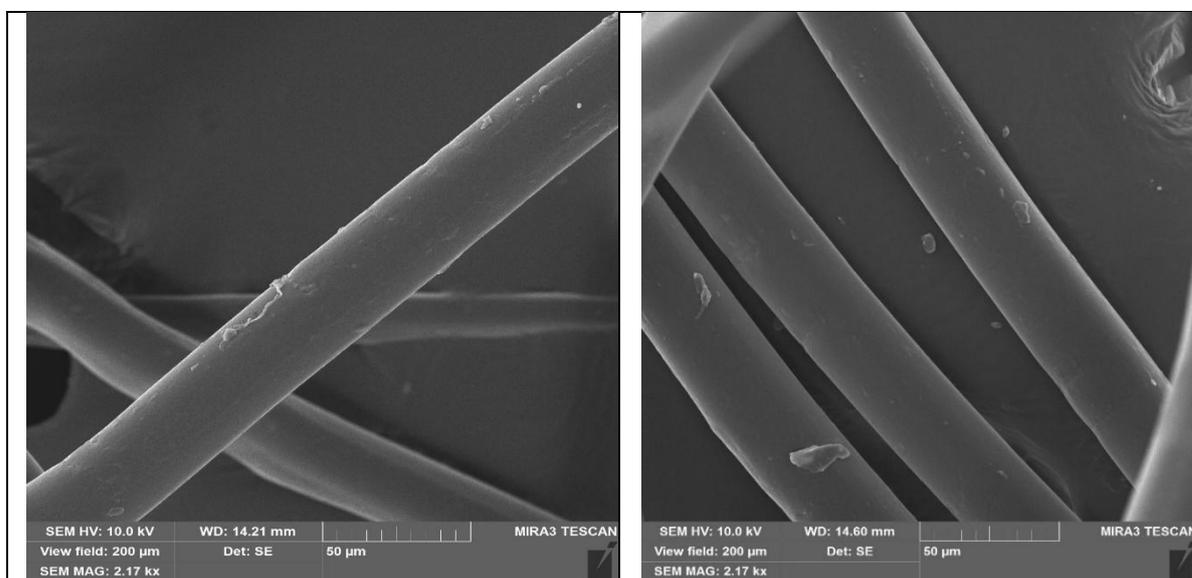


Рис. 14. СЕМ – зображення синтетичних наповнювачів, що інокульовані спорами грибів *Trichoderma* на 28 день тестування: а – наповнювач оброблений препаратом «Бактрим»; б – наповнювач не оброблений препаратом «Бактрим»

Отже, текстильні наповнювачі з синтетичних волокон, попередньо оброблених біоцидним препаратом «Бактрим», можна вважати грибостійкими до музейних штамів грибів. Також це сприятиме упродовж тривалого часу експлуатації виробу дотриманню відповідності санітарно – гігієнічним вимогам щодо мікробного навантаження.

Висновки. Таким чином, в результаті досліджень виявлено, що обробка наповнювачів постільних виробів біоцидним препаратом на основі триклозану надає наповнювачам біозахист, унеможливує ріст мікроорганізмів, попереджає біокорозію волокон, а також сприятиме дотриманню відповідності санітарно – гігієнічним вимогам щодо мікробного навантаження упродовж тривалого часу експлуатації постільного виробу.

Постільні вироби з текстильними наповнювачами, що оброблені біоцидним препаратом на основі триклозану відповідає медичним критеріями безпеки. Безпечність постільних виробів з об'ємними наповнювачами підтверджена висновком державної санітарно – епідеміологічної експертизи №602 – 123 – 20 – 1/928 від 23.01.2019 р.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Слізков А.М., Михайлова Г.М., Галько С.В., Платонова І.Л. Біопошкодження та захист целюлозовмісних об'ємних наповнювачів постільних виробів. *Вісник ЛТЕУ. Технічні наук.* 2020. Вип. 23. С.38–48.
2. Михайлова Г.М., Добарина А.О. Формування асортиментної політики та характеристика асортименту постільних виробів ТОВ «Герд Біллербек ГмбХ». *Легка промисловість.* 2016. № 2. С. 34–40.
3. Супрун Н.П., Островецька Ю.І. Методи визначення якісного та кількісного складу текстильних матеріалів: монографія. Київ: КНУТД, 2012. 108 с.
4. Поліщук С., Михайлова Г., Гілевіч Ю. Біоцидна обробка постільних виробів. *Україна та ЄС: подолання технічних бар'єрів у торгівлі: матеріали Міжн. наук. – практ. конф., 18–19 бер. 2015 р.* Київ: Київ. нац. торг. – екон. ун – т, 2015. С. 188–190.
5. Михайлова Г., Платонова І., Бричка С. Біостійкість текстильних наповнювачів для постільних виробів. *Товари і ринки.* 2018. № 3. С. 37–49.
6. Галик І. С., Концевич О. Б., Семак Б. Д. Екологічна безпека та біостійкість текстильних матеріалів : монографія. Львів : ЛКА, 2006. 232 с.
7. Галик І. С., Семак Б. Д., Семак З. М. Стандартизація вимог до екологічної безпеки текстилю. *Вісник ЛКА. Серія товарознавча.* 2013. Вип. 13. С. 41–46.
8. Галик І.С., Семак Б.Д., Семак З.М. Пошук ефективних способів захисту текстилю від дії шкідливих мікроорганізмів. *Вісник Львівської комерційної академії. Серія товарознавча .*2014. Вип. 14. С. 6–10.
9. Пахолюк О.В., Пушкар Г.О., Галик І.С., Семак Б.Д. Використання деяких поліфункціональних обробних препаратів для захисту текстильних целюлозовмісних матеріалів від мікробіологічних пошкоджень. *Вісник ХНУ.* 2019. № 1. С. 100–104.
10. Рацук М.Є. Робробка композиційних складів для надання антимікробних властивостей бавовняним тканинам: автореф. дис. на здобуття наук.ступеня канд. техн. наук 05.18.19. Херсон. 2009. 25 с.
11. Бричка С.Я., Супрун Н.П. Формування нанорозмірних частинок срібла в нетканих полотнах для ранових покриттів на базі шовкових тканин. *Вісник КНУТД.* 2016. № 2(96). С. 134–140.
12. Батрак О.А., Галавська Л.Є. Технології модифікації текстильних матеріалів. *Науково – практичні розробки учених в хімічній, харчовій та парфумерно – косметичній галузях промисловості: матеріали IV Всеукр. наук. – практ. конф. молодих учених і студентів.* 30–31 жовт. 2017 р. Херсон: ХНТУ, 2017. С. 21–22.
13. Параска О.А., Рак Т.С., Радек Н. Дослідження експлуатаційних властивостей текстильних виробів після обробки композиціями на основі екологічно безпечних речовин. *Вісник ХНУ.* 2018. Том 2. № 6 (267). С. 103–108.
14. Мартиросян І.А., Пахолюк О.В., Лубенець В.І. Вплив біоцидного оброблення целюлозовмісних текстильних матеріалів на зміну їх властивостей. *Вісник ХНУ.* 2018. Том 2. № 6 (267). С. 94–98.

15. Галик І.С., Семак Б.Д. Формування екологічної безпечності текстилю шляхом його поверхневої модифікації антимікробними препаратами. *Вісник ХНУ*. 2013. № 1. С. 251–254.
16. Галик І.С., Семак Б.Д. Захист екотекстилю від патогенних мікроорганізмів. *Вісник КНУТД. Серія «Технології та дизайн»*. 2014. № 6 (80). С. 143–149.
17. Семак Б.Б., Галик І.С., Семак Б.Д. Підвищення біостійкості та екологічної безпеки текстильних матеріалів шляхом їх поверхневої модифікації. *Вісник КНУТД*. 2007. № 4 (36). С. 47–51.
18. Пахолюк О.В., Мартиросян І.А. Сучасні біоцидні речовини для оброблення текстильних матеріалів: їхній склад та властивості. *Актуальні проблеми теорії і практики експертизи товарів: матеріали V Міжнар. наук. – практ. інтернет – конф., 20–22 бер. 2018 р.* Полтава: ПУЕТ, 2018. С. 290–294.
19. Михайлова Г.М., Осієвська В.В., Платонова І.Л. Оцінювання біостійкості постільних виробів з використанням інноваційних технологій. *Сучасне матеріалознавство та товарознавство: теорія, практика, освіта: матеріали VI Міжнар. наук. – практ. інтернет – конф., 14–15 бер. 2019 р.* Полтава: ПУЕТ, 2019. С. 49–52.
20. Гараніна О.О., Петрова – Кумінська С.В., Нінько К.С. Фарбування бавовняного текстильного матеріалу нерозчинним азобарвником із заданими антибактеріальними характеристиками. *TEX Feshin KYIV International Scientific Conference*. 1–2 November 2018. Kyiv. S. 26–29.
21. Михайлова Г.М., Гілевіч Ю.В. Спеціальна обробка текстильних наповнювачів для постільних речей. *Актуальні проблеми теорії і практики експертизи товарів: матеріали III Міжнар. наук. – практ. інтернет – конф., 16–18 бер. 2016 р.* Полтава: ПУЕТ. 2016. С. 354–356.
22. Textiles for protection / ed. R.A. Scott. Cambridge England: Woodhead Publishing limited, 2005. 754 p.
23. Kathiervelu S.S. Applications of nanotechnology in fibre finishing. *Synthetic Fibres*. 2003. #32. P.20–22.
24. Ханна Марк Д. Управління виробництвом з метою задоволення споживача. Київ: ЗАТ Vinol, 2003. 225 с.
25. Мазаракі А.А., Пугачевський Г.Ф. Модель Кано в системах управління якістю. *Стандартизація, сертифікація, якість*. 2004. № 3. С. 55 – 58.
26. Пугачевський Г.Ф., Осипенко Н.І. Методологічні засади формування показників якості текстильних матеріалів. *Стандартизація, сертифікація, якість*. 2005. № 2. С. 56–60.
27. Пугачевський Г.Ф., Михайлова Г.М. Життєвий цикл товару: сутність та застосування в товарознавстві. *Споживча політика України: виклики глобалізації та євроінтеграція* : матеріали Міжнар. наук. – практ. конф., 28 – 29 бер. 2012 р. Київ: Київ. нац. торг. – екон. ун – т, 2012. С. 129–133.
28. ДСТУ 3047 – 95 Тканини та вироби ткані поштучні. Класифікація та номенклатура показників якості. [Чинний 1996 – 01 – 01]. Київ, 1995. 25 с. (Національний стандарт України).
29. ДСТУ 3045 – 95 Полотна та вироби трикотажні. Хутро штучне трикотажне. Класифікація та номенклатура показників якості. [Чинний 1996 – 01 – 01]. Київ, 1995. 25 с. (Національний стандарт України).
30. Мережко Н., Михайлова Г., Осієвська В. Постільні вироби: систематизація показників властивостей за моделлю Кано. *Товари і ринки*. 2019. № 3. С. 75–86.
31. Global Biocides Market is Estimated to Grow at a Highest CAGR of 7.0% During 2018 – 2025: веб – сайт. URL: <https://www.marketwatch.com/press-release/global-biocides-market-is-estimated-to-grow-at-a-highest-cagr-of-70-during-2018-2025> – 2018 – 09 – 20 (дата звернення: 20.09.2018).

32. Biocide – treated Consumer Products Markets – Policies – Risks: веб – сайт. URL: http://www.pan-germany.org/download/biocides/biocide-treated_
33. EU Biocidal Products Regulation: Regulation (EU) No 528/2012 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products: веб – сайт. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32012R0528> (дата звернення: 23.10.2019).
34. European Commission. COMMISSION STAFF WORKING DOCUMENT. IMPACT ASSESSMENT Defining criteria for identifying endocrine disruptors in the context of the implementation of the plant protection products regulation and biocidal products regulation: URL: <https://ec.europa.eu/transparency/regdoc/rep/10102/2016/EN/SWD-2016-211-F1-EN-MAIN-PART-15.PDF/> (дата звернення: 23.10.2019).
35. Кодекс федеральних правил США: Code of Federal Regulations AE 2.106/3:7/ from January 1, 2003: веб – сайт. URL: <https://www.govinfo.gov/app/details/CFR-2003-title7-vol5/CFR-2003-title7-vol5-subtitleB-chapIII> (дата звернення: 23.10.2019).
36. Державний реєстр небезпечних факторів. Комітет з питань гігієнічного регламентування Міністерства охорони здоров'я України: веб – сайт. URL: <http://uhrc.gov.ua/registr/?ffl=%D2&fn=>(дата звернення: 23.10.2019).
37. Хрокало Л.А., Черниш І.В., Єфімова В.Г. Бактерицидні компоненти гігієнічних і косметичних засобів. *Наукові доповіді НУБіП України*. 2017. № 5 (69): веб – сайт. URL: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/article/view/9475> (дата звернення: 23.10.2019).
38. Zille A., Almeida L., Garneiro N., Esteves M., Silva J., Souto A. Application of nanotechnology in antimicrobial finishing of biomedical textiles / A. Zille, L. Almeida, N. Garneiro, M. Esteves, J. Silva, A. Souto //Materials Research Express. 2014. Vol. 1. P. 032003.
39. Постільний виріб з об'ємним наповнювачем з бактерицидними властивостями: пат. на корисну модель 139449 Україна: МПК B68G 1/00 B68П 3/00. № u 2019 05578; заявл. 23.05.2019 ; опубл. 10.01.2020, Бюл. 1.
40. Мартиросян І.А., Пахолук О.В., Семак Б.Д., Комаровська – Порохнявець О.З., Лубенець В.І., Памбук С.А. Нові технології еієктивного захисту текстилю від мікробіологічних пошкоджень. *Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології*. 2019. Т. 17. Вип. 4. С. 621–636.
41. Михайлова Г.М. Текстильні постільні вироби з об'ємними наповнювачами: монографія / Г.М. Михайлова, А.М. Слізков. – Київ: Держ. торг. – екон. ун – т, 2024. – 252 с.

1.6 РОСЛИННІ МЕТАБОЛІТИ ФЛАВОНОЇДНОЇ ПРИРОДИ ЯК ІНДУКТОРИ СИНТЕЗУ ФІТОГОРМОНІВ РИЗОБІЯМИ СОЇ

Леонова Н. О.,¹ Фоменко С. В.^{1,2}

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України

²Київський національний університет технологій та дизайну, Україна
natali_leonova@ukr.net

*Робота присвячена дослідженню синтезу позаклітинних фітогормональних сполук стимулювальної дії ауксинів та цитокінінів біотехнологічними штамами бульбочкових бактерій сої *Bradyrhizobium japonicum* за умов культивування у присутності флавоноїдних сполук кверцетину і даїдзеїну.*

Ключові слова: *фітогормони, ауксини, цитокініни, симбіоз, флавоноїди.*

Відомо, що еволюційно формування бобово – ризобіального симбіозу є послідовними етапами, що включає взаємодію партнерів за допомогою біохімічних медіаторів, що виділяються як рослиною, так і мікроорганізмами, адсорбцію бактеріальних клітин на поверхні корневих волосків, інфікування та утворення особливих симбіотичних форм – бактероїдів [1]. Специфічність цієї взаємодії потребує високого ступеня регуляції біохімічних процесів, у якій визначальне місце належить фітогормонам – групі природних сполук, відповідальних за збалансований перебіг процесів росту, розвитку та синхронне функціонування біохімічних механізмів у рослинному організмі [2]. Як рослина, так і бактерії, асоційовані з нею (як мікосимбіонти, так і ендofіти), синтезують сполуки фітогормональної природи, що є посередниками у комунікації між цими організмами, а також змінюють гормональний статус самої рослини, визначають ефективність формування та функціонування симбіотичних взаємовідносин [3].

Одним з найвагоміших результатів досліджень симбіотичної азотфіксації стало виявлення сигналів, які регулюють специфіку мікробно – рослинної взаємодії. Молекулярний механізм цієї взаємодії можна поділити на два етапи: на першому – молекули – індуктори флавоноїдної природи викликають експресію відповідних генів бульбочкоутворення рослини – хазяїна [4]. Продуктом цих генів є бактеріальний фактор (*Nod* – фактор), здатний активно впливати на рослину – хазяїна. Ці сигнальні молекули є похідними олігосахаридів і, в більшості, копіюють дію добре відомих рослинних гормонів, таких як ауксини і цитокініни. Вони здатні викликати численні зміни корневих волосків і індукувати диференціацію деяких клітин всередині кореня, що призводить до виникнення меристематичної тканини, яка дає початок утворенню нових бульбочок. При цьому є суттєва відмінність в дії *Nod* – факторів та рослинних

гормонів: тільки сигнали від комплементарного мікросимбіонта здатні викликати індукцію бульбочкоутворення, тобто кожний штам ризобій продукує певний набір *Nod* – факторів. Специфічність штамів ризобій стосовно тієї чи іншої рослини залежить як від якісного складу *Nod* – факторів, так і від їх співвідношення [5].

Флавоноїди є основними сигнальними молекулами в симбіозі бобових рослин та їх азотфіксуючих симбіонтів – ризобій. Основна функція флавоноїдів у взаємодії полягає в індукуванні транскрипції генів для біосинтезу ризобіальних сигнальних молекул під назвою *Nod* – фактори, які сприймаються рослиною для початку симбіотичної інфекції кореня [6]. Багато бобових рослин синтезують специфічні флавоноїди, які індукують вироблення *Nod* – фактору лише у гомологічних ризобій, і тому виступають важливими детермінантами хазяйської специфічності [7]. Незважаючи на безліч досліджень флавоноїдів бобових рослин, тільки для деяких підтверджена їх роль у ризобіальній інфекції. Останні дослідження свідчать, що синтез ключових «інфекційних» флавоноїдів локалізується на місцях зараження кореня бульбочковими бактеріями. Крім того, деякі флавоноїди, що синтезуються на місцях зараження, є фітоалексинами і можуть грати роль у відборі комплементарних симбіонтів вже під час процесу інфікування. Молекулярні деталі того, як регулюється синтез флавоноїдів у рослинах під час нодуляції, ще не з'ясований, але, як показано, наявність азоту у ґрунті відіграє певну роль [8].

Давно вже відомо, що у симбіозі соя – *Bradyrhizobium* флавоноїди геністеїн і даїдзеїн є вирішальними сигналами інфекції: вони обоє індукують *nod* – гени у *B. japonicum* [9], вони присутні в корневих ексудатах, а їх синтез індукується *Bradyrhizobium* та *Nod* – фактором [10]. Найважливішим доказом їх ролі є те, що блокування *IFS* значно знижує рівень цих ізофлавоноїдів та повністю блокує нодуляцію [11]. Однак, роль інших споріднених флавоноїдів не можна повністю виключати: геністеїн є попередником прунетину, який також індукується при формуванні симбіозу [8, 12] і є відносно сильним та селективним індуктором *nod* – генів у *Bradyrhizobium*, активуючи *NodD* у *B. japonicum* але не у *B. elkanii*. Спільною характеристикою цих флавоноїдів є те, що вони є симбіотично індукованими сполуками [13]. Відомо, що ризобії значно змінюють флавоноїдний профіль їх господаря [14], і багато симбіотично регульованих флавоноїдів мають *nod* – ген індуковану активність. Крім того, ці зміни флавоноїдного складу ексудатів рослини потребують, щоб інфекція була гомологічною (тобто вони не були індуковані гетерологічною ризобією) і тому цей процес не є частиною загальної захисної реакції рослини на бактерії, а натомість є ознакою симбіозу [15].

З огляду на це, флавоноїди привертають увагу дослідників з метою розширення даних про їх вплив на фізіологічну активність мікросимбіонтів рослин – бульбочкових бактерій. Раніше було досліджено вплив флавоноїдів даїдзеїну, кверцетину, геністеїну та нарінгеніну на

фізіологічну активність ризобій сої та функціонування основних ферментів асиміляції амонію [16, 17].

Тому метою роботи було дослідження синтезу позаклітинних фітогормональних сполук стимулювальної дії ауксинів та цитокінінів біотехнологічними штамми бульбочкових бактерій *B. japonicum* за умов культивування у присутності флавоноїдних сполук кверцетину і даїдзеїну.

Матеріали і методи

Об'єктами дослідження були високоефективні біотехнологічні штамми бульбочкових бактерій сої *Bradyrhizobium japonicum* IMB В – 7031 (УКМ В – 6035) та *Bradyrhizobium japonicum* IMB В – 7242 (УКМ В – 6018), що формують на коренях сої активний азотфіксувальний апарат, сприяють підвищенню урожаю та збільшенню вмісту протеїну в насінні сої. Штами зберігаються в колекції відділу загальної та ґрунтової мікробіології Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, вони депоновані в Українській колекції мікроорганізмів та входять до складу інокулянту Ековітал.

У роботі використано:

- синтетичні флавоноїди (стандарти): *даїдзеїн* – представник підгрупи ізофлавоноїдів та класу ізофлавононів, є одним із основних компонентів корневих ексудатів рослин сої та сигнальною молекулою соєво – ризобіального симбіозу; *кверцетин* – один з найпоширеніших флавоноїдів, зустрічається в більш, ніж 400 видах вищих рослин і відноситься до підгрупи еуфлавоноїдів та класу флавонолів. Флавоноїди виробництва *Sigma – Aldrich* (Німеччина);

- синтетичні фітогормони (стандарти, виробництва *Sigma – Aldrich* (Німеччина) та *Acros Organic* (Бельгія): *ауксини* – індол – 3 – оцтова кислота (IAA); індол – 3 – карбоксальдегід (ICal); індол – 3 – карбінол (IC); індол – 3 – карбоксилова кислота (ICA); індол – 3 – оцтової кислоти гідразид (IAA – hydr.); індол – 3 – масляна кислота (IBut); *цитокініни* – зеатин (Z); зеатинрибозид (ZR); кінетин (Kin); N^6 – (2 – ізопентеніл)аденін (IPA); N^6 – (2 – ізопентеніл)аденозин (IPAr).

Культивування ризобій сої здійснювали в періодичних умовах в колбах об'ємом 750 мл на качалці (220 об./хв) при температурі 28 – 30°C, рН 6,6 – 7,0 впродовж 72 – 96 год на рідкому поживному манітно – дріжджовому середовищі наступного складу (г/л): NaCl – 0,1; K_2HPO_4 – 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2; $FeCl_3$ – 0,01; маніт – 10,0; глюконат кальцію – 1,5; дріжджовий екстракт – 2,0; дистильована вода 1 л; рН 7,2. Як посівний матеріал використовували культуру *B. japonicum* у експоненційній фазі росту (92 – 96 год), вирощену на цьому ж середовищі. Кількість посівного матеріалу становила 5 % об'єму середовища.

Флавоноїди вносили у поживне середовище для культивування ризобій на початку експерименту у концентраціях 1000 нМ для даїдзеїну та 100 нМ – для кверцетину. Як було показано нами раніше, саме за дії цих концентрацій ростова активність у високоефективних штамів *B. japonicum* суттєво зростала [18].

Для відділення біомаси культуральну рідину бактерій центрифугували впродовж 20 хв при 9000 об./хв і температурі +4°C. Клітини бактерій відмивали від залишків екзополімерів фізіологічним розчином три рази і кожний раз центрифугували 20 хв при 9000 об./хв за кімнатної температури. Надосадові рідини використовували для подальших досліджень з метою екстракції фітогормональних сполук, а осад клітин суспендували в дистильованій воді, потім висушували при 103 – 105°C в сушильній шафі до постійної маси. Кількість абсолютно сухої біомаси мікроорганізмів визначали ваговим методом.

Позаклітинні фітогормони ауксини і цитокініни виділяли із супернатантів культуральних рідин ризобій шляхом екстракції наступними розчинниками: етилацетатом (ауксини), рН 3,0; н – бутанолом (цитокініни), рН 8,0 [19]. Екстракти випарювали під вакуумом при 40 – 45°C. Сухий залишок перерозчиняли у 80% – ному етанолі, переносили у мікропробірки. Отримані етанольні екстракти зберігали за температури – 24°C і використовували для накопичувальної тонкошарової хроматографії з подальшим проведенням якісного і кількісного визначення фітогормонів методом високоефективної рідинної хроматографії (HPLC/MS).

Попереднє очищення і концентрування фітогормонів проводили на пластинках із силікагелем марки «Silufol UV₂₅₄» («Chemapol», Чехія) у суміші розчинників, застосованих послідовно: хлороформ, 12,5 % водний аміак, етилацетат: оцтова кислота (20:1). Очищені таким чином фітогормональні екстракти ауксинів і цитокінінів аналізували методом HPLC/MS, який виконано у Центрі колективного користування приладами при Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

Якісне і кількісне визначення ауксинів проводили з використанням рідинного хроматографа Agilent 1200 (Agilent Technologies, США). В якості рухомої фази використовували метанол (А) та 1% розчин оцтової кислоти у воді (В). Розділення проводили на хроматографічній колонці Zorbax SB – C18 (2,1мм×150мм, 3 мкм) (Agilent Technologies, США), швидкість потоку через колонку 0,25 мл/хв, температура термостату 30 °С, об'єм інжекції 6 мкл. Елюювання проводили в градієнтному режимі: 0 хв – А (30 %): В (70 %); 25 хв – А(30 %): В (70 %); 35 хв – А (100 %): В (0 %); 35 хв – А (100 %): В (0 %). Детекцію сполук проводили з використанням діодно – матричного детектора з реєстрацією сигналу при 254 та 280 нм та фіксацією спектрів поглинання в діапазоні 191 – 700 нм. Для визначення молекулярних мас досліджуваних пігментів використовували мас – спектрометричний детектор Agilent G1956B (Agilent Technologies, США). Іонізацію проводили в режимі ESI та APCI з фіксацією позитивних іонів в режимі SCAN в діапазоні 100 – 1200 m/z. Калібрування проводили з використанням стандартних розчинів ауксинів, проби були проаналізовані у співвідношенні з отриманими піками для стандартів ауксинів на основі часу утримування.

Якісне і кількісне визначення цитокінінів проводили тим самим методом HPLC/MS, в якості рухомої фази використовували метанол (А) та 0,1% розчин мурашиної кислоти в воді (В). Розділення проводили на

хроматографічній колонці Zorbax SB – C18 (2,1мм×150мм, 3 мкм) (Agilent Technologies, США), швидкість потоку через колонку 0,25 мл/хв, температура термостату 30 °С, об'єм інжекції 6 мкл. Елюювання проводили в градієнтному режимі: 0 хв – А (20%): В (80 %); 25 хв – А (70 %): В (30 %); 35 хв – А (100 %): В (0 %); 35 хв – А (100 %): В (0 %).

Детекцію цитокінінів проводили аналогічно детекції ауксинів. Для визначення молекулярних мас досліджуваних фітогормонів використовували мас – спектрометричний детектор Agilent G1956В (Agilent Technologies, США). Іонізацію проводили в режимі ESI та APCI з фіксацією позитивних іонів в режимі SCAN в діапазоні 100 – 1200 m/z. Калібрування проводили з використанням стандартних розчинів цитокінінів. Кількість позаклітинних фітогормонів розраховували у мкг на 1 г абсолютно сухої біомаси (АСБ) продуцента.

Результати та їх обговорення

Вплив рослинних метаболітів флавоноїдної природи на синтез позаклітинних ауксинів біотехнологічними штамми ризобій сої. При дослідженні якісного і кількісного складу ауксинів методом HPLC/MS з використанням рідинного хроматографа та мас – спектрометричного детектора нами встановлено, що за внесення в середовище культивування флавоноїдів даїдзеїну та кверцетину ми отримали як стимуляцію, так і пригнічення синтезу цих речовин для обох штамів (табл. 1).

Таблиця 1. Позаклітинні ауксини *Bradyrhizobium japonicum* за внесення в середовище культивування флавоноїдів даїдзеїну та кверцетину (мкг/г абсолютно сухої біомаси)

| Штами ризобій | Ауксини | | | | | | |
|---------------------------------|---------|--------|-------|-------|-------|-------------|--------------------|
| | IAA | IBut | ICal | ICA | IC | IAA – hydr. | Загальна кількість |
| Без флавоноїдів | | | | | | | |
| УКМ В – 6018 | 33,72 | 68,69 | 12,45 | 36,21 | 8,81 | 195,75 | 355,63 |
| УКМ В – 6035 | 5,68 | сл. | сл. | 16,94 | сл. | 192,89 | 215,51 |
| За внесення даїдзеїну (1000 нМ) | | | | | | | |
| УКМ В – 6018 | сл. | 5,02 | сл. | 19,18 | сл. | 168,30 | 199,67 |
| УКМ В – 6035 | 403,16 | 12,02 | сл. | 45,93 | сл. | сл. | 461,11 |
| За внесення кверцетину (100 нМ) | | | | | | | |
| УКМ В – 6018 | 55,68 | 65,22 | сл. | 29,57 | 16,25 | 122,88 | 291,67 |
| УКМ В – 6035 | 164,04 | 192,15 | сл. | 87,13 | 47,89 | 362,01 | 859,24 |

* сл. – слідові кількості фітогормонів.

Встановлено, що синтез позаклітинних ауксинів високоактивними ризобіями сої *B. japonicum* УКМ В – 6018 та *B. japonicum* УКМ В – 6035 за

присутності у поживному середовищі флавоноїдів даїдзеїну та кверцетину мав штамову залежність. Крім того, нами відмічено однакову тенденцію щодо інгібувального впливу обох флавоноїдів на синтез ауксинів лише штамом *V. japonicum* УКМ В – 6018. Так, загальна кількість цих сполук у даного штаму зменшувалася у 1,8 раз за дії даїдзеїну та у 1,2 рази за дії кверцетину (табл. 1).

Крім того, синтез окремих фітогормонів ауксинової природи також у обох штамів відрізнявся. У *V. japonicum* УКМ В – 6018 за дії даїдзеїну було відмічено пригнічення синтезу індол – 3 – оцтової кислоти, індол – 3 – карбоксальдегіду та індол – 3 – карбінолу. Даних сполук у культуральних рідинах штаму знайдено не було. Що стосується інших індольних сполук, то даний флавоноїд інгібував їх синтез у 1,9 – 13,7 раз (індол – 3 – масляна кислота та індол – 3 – карбоксилова кислота) та на 14% він інгібував синтез індол – 3 – оцтової кислоти гідразиду.

Аналогічний ефект щодо деяких ауксинів нами було відмічено і за внесення у середовище культивування кверцетину. У *V. japonicum* УКМ В – 6018 спостерігалось повне пригнічення синтезу індол – 3 – карбоксальдегіду та інгібування синтезу індол – 3 – карбоксилової кислоти та індол – 3 – оцтової кислоти гідразиду у 1,2 – 1,6 разів. Але при цьому було відмічено зростання кількості лише індол – 3 – оцтової кислоти та індол – 3 – карбінолу, цей показник був у 1,7 – 1,9 раз більшим, ніж у контролі без кверцетину.

Натомість у іншого високоефективного штаму *V. japonicum* УКМ В – 6035 спостерігали стимуляцію синтезу ауксинів (загальна кількість), за дії даїдзеїну вона збільшувалася у 2,1 рази, а за дії кверцетину – у майже 4 рази до 859,24 мкг/г АСБ. Такий ефект відмічено як для загальної кількості ауксинів, так і для кожної сполуки окремо.

Даїдзеїн збільшував кількість позаклітинної індол – 3 – оцтової кислоти у *V. japonicum* УКМ В – 6035 у 70 разів, кількість індол – 3 – карбоксилової кислоти – у 2,7 раз. За дії цього ізофлавоноїду було виявлено індол – 3 – масляну кислоту у культуральній рідині, у контролі цієї сполуки не було. Але при цьому не було знайдено у даного штаму індол – 3 – оцтової кислоти гідразиду. Ймовірно, ця нестійка індольна сполука перетворилася на індол – 3 – оцтову кислоту, синтез якої у *V. japonicum* УКМ В – 6035 суттєво зріс.

Кверцетин теж стимулював синтез всіх ауксинових сполук у *V. japonicum* УКМ В – 6035. Кількість індол – 3 – оцтової кислоти зростала у 28 раз, індол – 3 – карбоксилової кислоти – у 5,1 раз, індол – 3 – оцтової кислоти гідразиду – у 1,9 раз. Також нами ідентифіковано появу досить великої кількості індол – 3 – масляної кислоти (192,15 мкг/г АСБ) та індол – 3 – карбінолу (47,89 мкг/г АСБ), яких у контролі без внесення флавоноїду відмічено не було.

Отримані нами дані збігаються з описаними раніше у літературі, що додавання флавоноїдів – індукторів нодуляції стимулює синтез фітогормонів ауксинової активності, зокрема, індол – 3 – оцтової кислоти у

ризобій. Мас – спектрометричний аналіз культуральних супернатантів показав, що штам *Rhizobium* sp. NGR234 синтезував цей ауксин за допомогою трьох різних шляхів [20]. Синтез індол – 3 – оцтової кислоти сильно збільшувався у результаті впливу на штам флавоноїду даїдзеїну *nodD1* – , *nodD2* – і *SyrM2* – залежним чином. Це пояснюється активізацією локуса *y4wEFG*, що кодує білки, які беруть участь у синтезі цього гормону. Описаний ефект може бути характерним і для дослідженого нами штаму *B. japonicum* УКМ В – 6035.

Окрім того відомо, що флавоноїди різної природи і у різних концентраціях можуть бути як стимуляторами, так й інгібіторами фізіологічної активності мікросимбіонтів [21]. Але такі дослідження на сьогодні майже не проводяться, тому у подальшому слід проводити дослідження з використанням ширшого діапазону концентрацій флавоноїдів, оскільки саме від них і залежить фізіологічна активність цих сполук по відношенню до мікроорганізмів – симбіонтів.

Синтез Bradyrhizobium japonicum позаклітинних фітогормонів цитокінінів за дії флавоноїдних сполук. При дослідженні якісного і кількісного складу позаклітинних цитокінінів методом HPLC/MS з використанням рідинного хроматографа та мас – спектрометричного детектора встановлено, що за внесення в середовище культивування флавоноїдів даїдзеїну та кверцетину ми отримали як стимуляцію, так і пригнічення синтезу цих речовин для обох штамів, тільки даний ефект вже залежав не від штаму ризобій, а від природи флавоноїда (табл. 2).

Таблиця 2. Позаклітинні цитокініни *Bradyrhizobium japonicum* за внесення в середовище культивування флавоноїдів даїдзеїну та кверцетину (мкг/г абсолютно сухої біомаси)

| Штами ризобій | Цитокініни | | | | | Загальна кількість |
|---------------------------------|------------|-------|-----|-------|-----|--------------------|
| | Z | ZR | IPA | IPAr | Kin | |
| Без флавоноїдів | | | | | | |
| УКМ В – 6018 | 218,0 | 675,0 | 4,6 | 184,6 | 7,3 | 1089,5 |
| УКМ В – 6035 | 47,3 | 583,7 | 5,1 | сл. | сл. | 636,1 |
| За внесення даїдзеїну (1000 нМ) | | | | | | |
| УКМ В – 6018 | 274,8 | 822,0 | 2,3 | 167,5 | сл. | 1266,6 |
| УКМ В – 6035 | 65,8 | 635,2 | 6,7 | 3,4 | сл. | 711,1 |
| За внесення кверцетину (100 нМ) | | | | | | |
| УКМ В – 6018 | 123,6 | 213,8 | сл. | 83,8 | сл. | 421,2 |
| УКМ В – 6035 | 16,5 | 415,7 | 7,5 | 2,0 | сл. | 441,7 |

* сл. – слідові кількості фітогормонів.

За внесення у поживне середовище даїдзеїну спостерігали збільшення синтезу цитокінінів у обох штамів *B. japonicum*. Кількість

позаклітинного зеатину зростала на 26% для *V. japonicum* УКМ В – 6018 та на 39% для *V. japonicum* УКМ В – 6035, також зростала кількість транспортної форми цитокінінів – зеатин – рибозиду, у штаму УКМ В – 6018 на 22%, а у штаму УКМ В – 6035 на 9%. Щодо кількості ізопентеніл – аденіна та ізопентеніл – аденозина за дії даїдзеїна, то вона несуттєво збільшувалася у штаму УКМ В – 6035, а у штаму УКМ В – 6018 навпаки, несуттєво зменшувалася. Загальна ж кількість позаклітинних цитокінінів при внесенні даного ізофлавоноїду зростала у обох штамі на 11 – 16%.

Результати кількісного вмісту цитокінінів за внесення кверцетину мають протилежну закономірність, нами відмічено суттєве їх інгібування для досліджених ризобій. Кількість зеатину зменшувалася на 43,3 – 65,0%, зеатин – рибозиду – у 1,4 – 3,16 раз, а ізопентеніл – аденозину – на 45%. Загальна кількість позаклітинних цитокінінів у *V. japonicum* за дії цього флавоноїду зменшувалася на 30,56 – 61,3%.

Слід також відмітити, що у всіх досліджених штамів серед пулу синтезованих цитокінінів рівень зеатину і його транспортної форми зеатин – рибозиду складав найбільший відсоток, що не суперечить даним літератури та підтверджує думку про важливість даних сполук у формуванні взаємодії цих мікроорганізмів з рослиною – господарем. Зокрема, з літератури відома здатність бактерій накопичувати рибозильовані і глюкозильовані (транспортні) форми цитокінінів, що мають знижену фізіологічну активність, регулюючи в такий спосіб концентрацію фізіологічно активних форм цитокінінів [22].

За умов ризобіальної інфекції у бобової рослини бульбочки утворюються з диференційованих клітин кори кореня, що й надалі продовжують диференціювання та формують бульбочкові примордії, так звані «зачатки бульбочок», саме ці процеси і контролюються цитокінінами [23]. Фітогормони, зокрема цитокініни, відіграють також ключову роль у регуляції органогенезу і впливають на подальшу клітинну проліферацію, подовження, диференціацію, або старіння бульбочок залежно від стадії розвитку симбіозу [24]. Крім того, цитокініни також можуть впливати на бактеріальну інфекцію, контролюючи експресію генів *NIN* (*Nodule Inception*) та інших транскрипційних регуляторів за допомогою механізмів, що діють системно та більш локально [25].

Висновки. Таким чином, дослідження впливу флавоноїдів даїдзеїну та кверцетину на здатність ризобій сої (*Bradyrhizobium japonicum*) синтезувати фітогормональні сполуки зі стимулювальною дією показало відсутність кореляції з їх нітрогеназною активністю. Синтез позаклітинних ауксинів високоактивними штамми *V. japonicum* УКМ В – 6018 та *V. japonicum* УКМ В – 6035 за присутності у поживному середовищі індукторів даїдзеїну та кверцетину відрізнявся. Відмічено однакову тенденцію щодо інгібувального впливу обох флавоноїдів на синтез ауксинів лише штамом *V. japonicum* УКМ В – 6018, загальна кількість цих сполук зменшувалася у 1,8 раз за дії даїдзеїну та у 1,2 рази за дії кверцетину. При внесенні у поживне середовище даїдзеїну спостерігали

збільшення синтезу цитокінінів у обох штамів *B. japonicum*. Кількість позаклітинного зеатину зростала на 26% для *B. japonicum* УКМ В – 6018 та на 39% для *B. japonicum* УКМ В – 6035. Результати кількісного вмісту цитокінінів за внесення кверцетину мають протилежну закономірність, відмічено суттєве їх інгібування для досліджених ризобій. Кількість зеатину зменшувалася на 43,3 – 65,0%, зеатин – рибозиду – у 1,4 – 3,16 раз.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Multiple benefits of legumes for agriculture sustainability: an overview / F. Stagnari et al. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 2017. Vol. 4, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0085-1>
2. Role of phytohormones in legumes infected intercellularly by rhizobia without infection threads formation / M. S. Figueredo et al. *Rhizosphere*. 2022. Vol. 24. P. 100622. URL: <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100622>
3. Mathesius U. Hormonal interactions in the regulation of the nitrogen – fixing legume – *Rhizobium* symbiosis. *Advances in Botanical Research*. 2020. P. 41–66. URL: <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2019.09.010>
4. Dong W, Song Y. The significance of flavonoids in the process of biological nitrogen fixation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(16):5926. <https://doi.org/10.3390/ijms21165926>
5. Biological activity of *Nod* factors / D. Kidaj et al. *Acta Biochimica Polonica*. 2020. URL: https://doi.org/10.18388/abp.2020_5353
6. Liu C. – W., Murray J. The role of flavonoids in nodulation host – range specificity: An Update. *Plants*. 2016. Vol. 5, no. 3. P. 33. URL: <https://doi.org/10.3390/plants5030033>
7. The rules of engagement in the legume – rhizobial symbiosis / G. E. D. Oldroyd et al. *Annual Review of Genetics*. 2011. Vol. 45, no. 1. P. 119–144. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132549>
8. Soybean metabolites regulated in root hairs in response to the symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* / L. Brechenmacher et al. *Plant Physiology*. 2010. Vol. 153, no. 4. P. 1808–1822. URL: <https://doi.org/10.1104/pp.110.157800>
9. Release of flavonoids by the soybean cultivars Mccall and Peking and their perception as signals by the nitrogen – fixing symbiont *Sinorhizobium fredii* / S.G. Pueppke et al. *Plant Physiol*. 1998. Vol. 117. P. 599–608.
10. Schmidt P.E., Broughton W.J., Werner D. *Nod* factors of *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium* sp. NGR234 induce flavonoid accumulation in soybean root exudate. *Mol. Plant – Microbe Interact*. 1994. Vol. 7. P. 384–390.
11. Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum* / S. Subramanian S. et al. *Plant J*. 2006. Vol. 48. P. 261–273.
12. Duzan H. M. Perception of *Bradyrhizobium japonicum* *Nod* factor by soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] root hairs under abiotic stress conditions. *Journal of Experimental Botany*. 2004. Vol. 55, no. 408. P. 2641–2646. URL: <https://doi.org/10.1093/jxb/erh265>
13. Yokoyama T. Flavonoid – responsive *NodY* – *lacZ* expression in three phylogenetically different *Bradyrhizobium* groups. *Can. J. Microbiol*. 2008. Vol. 54. P. 401–410.
14. Lawson C.G.R., Rolfe B.G., Djordjevic M.A. *Rhizobium* inoculation induces condition – dependent changes in the flavonoid composition of root exudates from *Trifolium subterraneum*. *Aust. J. Plant Physiol*. 1996. Vol. 23. P. 93–101.
15. Inoculation of *Vicia sativa* subsp. *nigra* roots with *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* results in release of *nod* gene activating flavanones and chalcones / K. Recourt

et al. *Plant Molecular Biology*. 1991. Vol. 16, no. 5. P. 841–852.
URL: <https://doi.org/10.1007/bf00015076>

16. Активність основних ферментів асиміляції амонію у *Bradyrhizobium japonicum* за дії рослинних індукторів флавоноїдної природи / Г.О. Іутинська та ін. *Мікробіол. журн.* 2010. 72, № 6. С. 23–29.

17. Фізіологічна активність бульбочкових бактерій сої (*Bradyrhizobium japonicum*) за дії флавоноїдів / Н.О. Леонова та ін. *Наук. Вісник ЧНУ, Серія: Біологія*. 2005. 252. С. 132–139.

18. Леонова Н.О. Фізіологічна активність *Bradyrhizobium japonicum* та ефективність соєво – ризобіального симбіозу за дії фіторегулювальних речовин : автореф. дис...канд. біол. наук. Київ, 2006. 24 с.

19. Shcherbatiuk M.M., Voytenko L.V., Vasyuk V.A., Kosakivska I.V. Method for quantitative determination of phytohormones in plant tissues. *Studia Biologica*, 2020: 14(2); 117–136. <https://doi.org/10.30970/sbi.1402.624>

20. Flavonoids, NodD1, NodD2, and Nod – Box NB15 modulate expression of the y4wEFG locus that is required for indole – 3 – acetic acid synthesis in *Rhizobium* sp. strain NGR234 / M. Theunis et al. *Molecular Plant – Microbe Interactions*®. 2004. Vol. 17, no. 10. P. 1153–1161. URL: <https://doi.org/10.1094/mpmi.2004.17.10.1153>

21. The *Rhizobiaceae* / ed. by H. P. Spaink, A. Kondorosi, P. J. J. Hooykaas. Dordrecht : Springer Netherlands, 1998. URL: <https://doi.org/10.1007/978-94-011-5060-6>

22. Cytokinins in symbiotic nodulation: when, where, what for? / P. Gamas et al. *Trends in Plant Science*. 2017. Vol. 22, no. 9. P. 792–802. URL: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.06.012>

23. A phylogenetic strategy based on a legume – specific whole genome duplication yields symbiotic cytokinin type – A response regulators / R. H. M. Op den Camp et al. *Plant Physiology*. 2011. Vol. 157, no. 4. P. 2013–2022. URL: <https://doi.org/10.1104/pp.111.187526>

24. Suzaki T., Ito M., Kawaguchi M. Genetic basis of cytokinin and auxin functions during root nodule development. *Frontiers in Plant Science*. 2013. Vol. 4. URL: <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00042>

25. Buhian W. P., Bensemhen S. Mini – review: *Nod* factor regulation of phytohormone signaling and homeostasis during *Rhizobia* – legume symbiosis. *Frontiers in Plant Science*. 2018. Vol. 9. URL: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01247>

1.7 ОСОБЛИВОСТІ ВИРОБНИЦТВА ТА ЗАСТОСУВАННЯ КЛІТИННИХ СТІНОК *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Курило О. П.¹, Губрій З. В.¹, Красовська О. С.²,
Булботка Н. В.², Чепіга Т. В.²

¹Національний університет «Львівська політехніка», Україна

²ТОВ «Компанія Ензим», Україна

zoriana.v.hubrii@lpnu.ua

*Розробка оптимального біотехнологічного процесу отримання клітинних стінок дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* з високим вмістом β – глюкозів, маннаноолігосахаридів і білків для використання у кормових добавках. Протестовано кілька варіантів гідролізу, зокрема лужний, лужний з протеазою та з кислотною обробкою. Встановлено, що використання лужної обробки з протеазою підвищує вихід β – глюкозів до 54,4% (порівняно з 35,1% у базових стінках). Визначено, що підняття рН до 10 і використання протеази підвищують вихід β – глюкозів, а коригування фінального рН до 7 забезпечує відповідність вимогам до кормових добавок. Кормова добавка позитивно вплинула на приріст маси тіла та виживання бройлерів.*

Ключові слова: *клітинні стінки, *Saccharomyces cerevisiae*, гідроліз, β – глюкози, білки, маннани, кормові добавки.*

Використання клітинних стінок дріжджів стало перспективною альтернативою в різних біопроцесах завдяки їх універсальності та потенціалу для багатьох промислових застосувань. Ці біополімерні структури характеризуються складним хімічним складом і функціональною активністю, що зумовлює їхні унікальні адсорбційні, імуномодулюючі та технологічні властивості. Завдяки цьому клітинні стінки дріжджів розглядаються як ефективна сировина для створення біосорбентів, харчових добавок, фармацевтичних препаратів та засобів біоремедіації. Зростаючий інтерес до використання таких біологічних матеріалів зумовлений потребою у безпечних, екологічно чистих та економічно вигідних технологіях, що відповідають сучасним вимогам сталого розвитку. Тому дослідження властивостей і можливостей застосування клітинних стінок дріжджів набуває особливої актуальності в умовах інтенсифікації біотехнологічних процесів.

Клітинні стінки дріжджів використовуються як інкапсулятори для пробіотиків, щоб захистити їх під час шлунково – кишкового транзиту. Подрібнені дріжджові клітини застосовували для інкапсуляції більших пробіотичних бактерій, таких як *Lactobacillus acidophilus* і *Bifidobacterium bifidum*. Цей метод продемонстрував покращений рівень виживання цих пробіотиків у змодельованих умовах шлунково – кишкового тракту, що підкреслює захисну ефективність сполук клітинної стінки дріжджів [1].

Розвиток технології відображення на поверхні дріжджів дозволив представити функціональні білки на зовнішній стороні дріжджових клітин. Цей прогрес сприяв застосуванню дріжджів для відновлення навколишнього середовища, наприклад, для біоадсорбції важких металів зі стічних вод. Сконструйовані штами дріжджів, що містять металозв'язуючі пептиди, продемонстрували підвищену здатність відновлювати такі метали, як кадмій і ртуть, що сприяє більш ефективним стратегіям біоремедіації [2].

Успіхи в розумінні структурних особливостей полісахаридів клітинної стінки дріжджів відкрили нові шляхи їх біомедичного застосування. Нещодавні дослідження виявили унікальні конфігурації β – глюканів та маннопротеїнів, які взаємодіють зі специфічними клітинними рецепторами, запускаючи цільові біологічні реакції. Ці відкриття призвели до розробки матеріалів на основі дріжджів для використання в імунотерапії, тканинній інженерії та в якості систем доставки ліків, демонструючи універсальність дріжджових полісахаридів у медицині [2].

Зусилля, спрямовані на покращення функціональності клітин дріжджів з поверхневою інженерією, призвели до розробки стратегій, спрямованих на зміну морфології клітинної стінки. Модифікуючи експресію специфічних білків клітинної стінки, дослідники досягли змін у структурі клітинної стінки, які підвищують рівень прояву цільових білків. Ці модифікації призвели до підвищення ферментативної активності та стабільності, що є корисним для різних промислових процесів [3].

Функціональні групи, присутні в клітинних стінках дріжджів, такі як карбоксилатні, фосфатні та гідроксильні групи, були використані в екологічних цілях. Сконструйовані штами дріжджів, що містять металозв'язуючі пептиди, продемонстрували підвищену здатність до адсорбції важких металів, таких як кадмій і ртуть, зі стічних вод, що сприяє більш ефективним стратегіям біоремедіації [4].

Досягнення в технології відображення на поверхні дріжджів сприяли розробці біосенсорів і вакцин на основі дріжджів. Закріплюючи функціональні білки або антигени на клітинній стінці дріжджів, дослідники створили біосенсори, здатні виявляти патогени та біомаркери. Наприклад, дріжджові клітини, що містять вірусні антигени, були використані для виявлення антитіл проти вірусу гепатиту С та SARS – CoV – 2, що демонструє їхній потенціал у діагностиці. Крім того, були розроблені оральні вакцини на основі дріжджів, що містять антигени патогенів, таких як вірус синдрому білої плями, і викликають захисну імунну відповідь у тваринних моделях [4].

Сучасні пошуки метаболічної інженерії зосереджені на оптимізації *S. cerevisiae* для надмірного виробництва цінних сполук, таких як каротиноїди. Змінивши геномні послідовності та критичні шляхи, дослідники покращили здатність дріжджів виробляти β – каротин, попередник вітаміну А. Ці модифікації включають збільшення доступності ацетил – КоА, пригнічення конкуруючих шляхів, таких як синтез ергостеролу, та введення людських ліпідзв'язуючих білків для покращення

зберігання каротиноїдів у клітинах дріжджів. Такі досягнення пропонують стійку та економічно ефективну альтернативу синтетичному виробництву каротиноїдів [5].

Таким чином, клітинна стінка *S. cerevisiae* є складною та адаптивною структурою зі значним біотехнологічним потенціалом. Подальші дослідження її виробництва та використання обіцяють різноманітні промислові застосування – від вдосконалення пробіотичних препаратів до розробки нових стратегій біоремедіації. Отже, клітинні стінки дріжджів є доступною, численною та відновлюваною сировиною в контексті циркулярної економіки.

Основні компоненти клітинної стінки дріжджів: маннопротеїни, β – глюкани та хітин – мають ряд властивостей, включаючи пребіотичну активність, імуномодулюючу дію та здатність адсорбувати забруднюючі речовини.

β – глюкани – це цінні полісахариди, які здебільшого використовуються в різних сферах, таких як продукти харчування і напої, косметика, дієтологія, фармація та корми для тварин. Зважаючи на важливість цього полімеру, деякі дослідження вивчають альтернативи для збільшення його виробництва та зниження собівартості процесу.

В аквакультури та індустрії аквакормів введення 2 г/кг β – глюканів у раціон риби *Scophthalmus maximus* виявилось ефективним для зменшення проблем з імунітетом та запалення в її шлунково – кишковому тракті, спричинених споживанням соєвого шроту [6]. Добавка дріжджових β – глюканів продемонструвала захисний вплив на імунітет культури через збільшення концентрації IgM, зменшення кількості лейкоцитів та загальне покращення кишкової мікробіоти.

Використання β – глюканів у медицині досліджувалося в контексті лікування раку. Розробка модифікованих гіалуроновою кислотою дріжджових β – глюканових частинок було використано як частина системи доставки ліків, спрямованої на доксорубіцин (DOX) – протипухлинний засіб, що використовується для лікування раку молочної залози. Метою цієї системи з β – глюканом було пом'якшення фізіологічної токсичності, пов'язаної з DOX. Глюканові везикули, отримані з дріжджів, виявилися перспективною альтернативою для зменшення росту пухлин і зниження несприятливих наслідків DOX [7]. В іншому дослідженні вчені створили аерогелі для доставки ліків з β – глюкану *S. cerevisiae*, які були підготовлені шляхом надкритичного висушування гідрогелів [6]. Автори також повідомляють, що морфологічні та структурні властивості аерогелів, отриманих з дріжджів, демонструють вищу густину, стійкість до стресу стиснення та більше водопоглинання порівняно з ячмінним β – глюканом [8].

Інші біотехнологічні застосування β – глюкану включають його використання як інгредієнта косметичних засобів для шкіри та здатність адсорбувати іони металів [9].

Враховуючи, що β – глюкани складають приблизно 60% структури клітинної стінки дріжджів, повторне використання залишкових

мікроорганізмів з біотехнологічних процесів може бути перспективним альтернативним джерелом для отримання цієї сполуки.

Маннопротеїни з їх різноманітними функціями та промисловим застосуванням мають важливе значення, оскільки їх диференційований склад забезпечує стабільність. У харчовій промисловості маннопротеїни зазвичай використовують для підсилення смаку та покращення органолептичних характеристик продуктів харчування та вина [10, 11]. Наприклад, додавання дріжджового маннопротеїну значно покращило якість шовковичного соку. Це було досягнуто шляхом ефективної стабілізації антоціанів, які були порушені через вплив ультрафіолетового випромінювання.

Дослідження показали антиоксидантні та омолоджуючі властивості ферментативних гідролізатів, отриманих із клітинних стінок дріжджів, багатих на маннопротеїни, як це спостерігалось на тваринній моделі *Caenorhabditis elegans*. Ця активність пояснюється підвищенням рівня антиоксидантних ферментів, таких як супероксиддисмутаза (СОД), глутатіонпероксидаза (GSH – PX) і каталаза (КАТ). Отже, ці висновки сприяють зосередженню уваги на розробці функціональних продуктів харчування, доповнених дріжджами [12].

Хітин є другим за поширеністю природним полісахаридом після целюлози і має цікаві функціональні властивості, які викликали дослідницький інтерес у багатьох промислових секторах. Цей полімер має низьку токсичність, здатність до біологічного розкладання, фізіологічну інертність і спорідненість до білків [13]. Потенціал хітину можна пояснити широким спектром його застосування – від використання в якості адсорбенту промислових забруднювачів до розробки біомедичних матеріалів, що розкладаються [14, 15].

Біотехнологічні застосування хітину не обмежуються хімією або медициною, але також є потенціал для іммобілізації ферментів, виробництва гідрогелів, біосенсорів та доставки ліків [16]. Іммобілізація ферментів на хітинових носіях особливо важлива, оскільки вони біосумісні, біологічно розкладаються, мають багато функціональних груп і сприяють більшій стабільності ферментів. На біоетанольних заводах іммобілізація протеолітичних ферментів на хітині та хітозані була досліджена для дефлокуляції клітин *S. cerevisiae* [16]. Дослідники повідомили про розробку покритих хітозаном магнітних наночастинок з Fe_3O_4 , що слугують основою для іммобілізації целюлази [17]. Нещодавно були отримані багатообіцяючі результати в біоремедіації мікрозабруднювачів (хлорофенолів і сульфаніламідів) з використанням хітинової основи для іммобілізації бактеріальних лакказ, які досягають 100% видалення, залежно від сполуки та умов, що використовуються [18].

Розробка біосенсорів на основі хітозану може підвищити провідність і чутливість у визначенні широкого спектру біологічних аналітів, включаючи фенол, H_2O_2 , ацетамінофен і L – аскорбінову кислоту [19].

У медицині проводяться широкі дослідження з розробки препаратів з використанням хітину та його похідних, що мають різноманітне терапевтичне застосування [20]. Серед цих застосувань виділяються: доставка ліків, білків і пептидів, доставка нуклеїнових кислот, тканинна інженерія та діагностика раку [21, 22]. Універсальність і корисні властивості клітинних стінок дріжджів роблять їх привабливим ресурсом, сприяючи розвитку біотехнологій.

Мета дослідження: оптимізувати біотехнологічний процес виділення компонентів клітинних стінок дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, зокрема β – глюканів, маннаноолігосахаридів та білків, шляхом тестування різних методів гідролізу (лужного, ферментативного, кислотного) та встановлення найбільш ефективних умов (рН, температура, час).

Об'єкт дослідження: клітинні стінки дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, як вторинна сировина біотехнологічних процесів.

Предмет дослідження: кількісні та якісні зміни у хімічному складі клітинних стінок дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, спричинені варіантами лужної та ферментативної екстракції з метою оптимізації вмісту β – глюканів для розробки кормової добавки.

Методи та матеріали

Експерименти проводилися на базі R&D центру Enzym Group у Львові. Культивування *S. cerevisiae* здійснювали у біореакторі, об'ємом 30 л, далі проводили автоліз з використанням ферментних препаратів, температурною та рН – стабілізацією. Отриманий автолізат розділяли на фракції. Було протестовано кілька варіантів гідролізу, зокрема лужний, лужний з протеазою та з додатковою кислотною обробкою для підвищення виходу цільових компонентів. Біохімічний аналіз вмісту проводили за допомогою методу Дюма, спектрофотометрії та високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Для визначення рівня азоту використовували автоматичний аналізатор Дюма, побудова калібрувальної кривої відбувалася по етилендіамінтетраоцтвій кислоті. Для визначення маннаноолігосахаридів та β – глюканів було використано ВЕРХ. Також кількісне визначення цих сполук відбувалось спектроскопічно ($\lambda=260$ нм, Тколони=40°C), калібрувальна крива будувалась відносно стандартів.

Клітинні стінки *S. cerevisiae* – це безбарвні, аморфні та жорсткі структури, які з допомогою електронної мікроскопії візуалізуються як товста оболонка. Вони мають товщину приблизно від 100 до 200 нм і складають від 15 до 30 відсотків сухої ваги дріжджової клітини. Клітинна стінка складається переважно з полісахаридів і глікопротеїнів, включаючи β – 1,3 – глюкани (50 – 60%), β – 1,6 – глюкани (10 – 20%), манопротеїни (30 – 40%) і хітин (1 – 3%). Ці компоненти зшиті в нерозчинну, механічно міцну мережу.

Молекулярна маса клітинної стінки не є точно визначеною через її полімерну природу, але окремі глюкани та манопротеїни можуть варіювати від десятків до сотень кілодальтон. Густина висушеного матеріалу клітинної стінки дріжджів коливається від 1200 до 1400 кг/м³

залежно від ступеня гідратації. Він нерозчинний у воді та більшості органічних розчинників, але частково розчинний у сильних кислотах і лугах. Поверхня стінки має ізоелектричну точку при рН від 3 до 4, що вказує на чистий негативний заряд за фізіологічних умов.

Клітинні стінки дріжджів не мають певної температури плавлення або кипіння, але починають термічно руйнуватися при температурі 150 – 180°C. Вони стабільні при кімнатній температурі і стійкі до помірного нагрівання. Теплоємність важко визначити точно через складність матеріалу, але біополімери на основі глюкану зазвичай мають питому теплоємність від 1,2 до 1,8 Дж/г – К. Стінка біологічно розкладається і піддається ферментативному розщепленню β – глюканазами і хітиназами.

Основна увага в цьому дослідженні приділяється розробці оптимального біотехнологічного процесу отримання клітинних стінок дріжджів з високим вмістом β – глюканів, маннаноолігосахаридів і білків для використання у кормових добавках.

Результати та обговорення

Після фази росту дріжджову біомасу збирали центрифугуванням і промивали водою для видалення залишкових компонентів середовища. Промитий дріжджовий концентрат (18 – 20% сухих речовин) піддавали в контрольованих умовах ферментативному гідролізу при температурі 55°C та рН=7,0. Процес автолізу відбувався при постійному перемішуванні та сталій температурі, регулюючи рН розчином NaOH і сульфатною кислотою. Через 2 год автолізу при температурі 55 °C додавали фермент Tailorzyme. Продовжували процес за цих умов ще 5 год. Через 7 год автолізу температуру підвищували до 80°C для інактивації ферментів і через 10 хв знижували до 70°C. Автолізат подавали на стадію сепарації для поділу рідкої та твердої фракцій. Після завершення процесу сепарації отримували об'єднану рідку фракцію – дріжджовий екстракт, що містить 11% с.р. і фракцію з осадом – клітинні стінки, що містять 16 % с.р. На останньому етапі промиті клітинні стінки висушували за допомогою розпилювальної сушарки до отримання порошкоподібного продукту.

Найбільш поширеними методами вилучення клітинних компонентів, в т.ч. β – глюканів, з дріжджів є: кислотна екстракція, лужна екстракція, комбінована кислотно – лужна екстракція, ферментативна екстракція та ферментативно – лужна екстракція. Наприклад, кислотно – основну екстракцію можна проводити з використанням різних реагентів: екстракція NaOH/HCl, екстракція NaOH/CH₃COOH, екстракція NaOH/NaClO та екстракція NaClO/DMCO. Найбільш прийнятний метод екстракції залежить від джерел і структури β – глюканів. Вартість виробництва β – глюканів залежить від кількох факторів, включаючи джерело бета – глюканів, бажану чистоту та властивості кінцевого продукту та масштаб виробництва. Іншим способом зниження витрат є оптимізація процесу екстракції. Наприклад, температуру екстракції та рН можна регулювати для оптимізації виходу та чистоти бета – глюканів. Крім того,

використання ферментів та інших добавок може допомогти підвищити ефективність процесу екстракції.

У ході виконання експерименту було проведено ряд досліджень. Основним завданням було визначити такі біохімічні показники: вміст бета – глюкозів, білків, мананолігосахаридів.

Таблиця 1. Дослідження гідролізу клітинних стінок

| Стадійність процесу | Дії для досягнення результату | Мета/очікуваний ефект |
|---------------------|---|--|
| Дві стадії | Лужний гідроліз+використання протеази | Гідроліз білка, ліпідів, відщеплення білка |
| | Додавання стадії кислотного гідролізу | Видалення маннанопротеїнів |
| Одна стадія | Відсутність ферменту (лише лужний гідроліз) | Здешевлення процесу. Оцінка впливу ферментів. |
| | Підняття рН до 10 під час лужного гідролізу | Підвищення впливу лужного гідролізу |
| | Коригування рівня рН перед сепарацією | Отримання рівня рН, допустимого для використання у кормових добавках |
| | Зменшення часу лужного гідролізу | Скорочення часу впливу високого рівня рН на обладнання |

У ході проведених експериментів було вирішено отримувати β – глюкози з одержаних та висушених за описаною вище методикою клітинних стінок дріжджів шляхом лужної екстракції (рН=9), використовуючи розчин гідроксиду натрію при температурі 90°C, протягом 5 годин.

Таблиця 2. Результати досліджень складу клітинних стінок після гідролізу

| Тип обробки | β – глюкози, % | Маннан, % | Білок, % | Інше, % |
|--------------------------------|----------------------|-----------|----------|---------|
| Склад базових клітинних стінок | 35,1 | 17,1 | 32,0 | 15,9 |
| Лужна (рН=9) | 42,7 | 7,5 | 18,7 | 31,2 |
| Лужна (рН=9)+кислотна | 41,5 | 3,4 | 25,6 | 29,5 |
| Лужна (рН=9)+протеаза | 54,4 | 5,6 | 17,4 | 22,7 |
| Лужна (рН=9)+кислотна+протеаза | 52,6 | 5,3 | 18,6 | 23,6 |
| Лужна (рН=10) | 62,62 | 4,12 | 15,3 | 17,96 |
| Лужна (рН=10)+кислотна | 41,54 | 3,37 | 25,6 | 29,49 |

Також додатково в одному зразку проводили кислотну обробку концентрованою сульфатною кислотою (рН=4, Т=90 °С, t=3 годин). Кислотна обробка не виправдала очікуваний результат. Значних змін відсоткового співвідношення бета – глюкозів у продукті не спостерігалось. Вихід β – глюкозів при цьому не зріс (42,7% та 41,5%).

Після цього дослідні зразки піддавали обробці протеазою, що дозволило збільшити вихід β – глюкозів (54,4% та 52,6%

відповідно). Також було встановлено, що підвищення рН до 10 під час лужної обробки збільшує вихід β – глюканів на 20% (з 42% до 62%).

З отриманих результатів випливає, що якщо цільовим продуктом є β – глюкани, то найбільш оптимальним режимом екстракції є лужна обробка (рН=9) з подальшим використанням протеази, якщо бажаним цільовим продуктом є маннани – лужна (рН=9), оскільки вихід буде трішки вищий, ніж при лужній (рН=9), але вона технологічно простіша. Якщо цільовий продукт білок, найкращим технологічним режимом буде лужна (рН=9)+кислотна обробка, хоча в неї такий ж вихід як і при лужній (рН=10)+кислотній, проте вона технологічно простіша.

Важливою вимогою при створенні кормових добавок є їх значення рівня рН, а саме він має бути 7,0. Проведено серію дослідів у яких перевіряли фізико – хімічні показники кормової добавки на основі β – глюкану клітинних стінок дріжджів та встановлено, що при нейтральному значенні рН β – глюкани легше осаджуються при центрифугуванні, а також мінімізується взаємодія компонентів добавки.

З отриманих результатів видно, що найвищий вміст β – глюканів був у зразку, який був екстрагований при таких умовах $rH_{\text{процесу}} = 10$, $T=90$ °С, $t=3$ год, $rH_{\text{фінальне}}=7,0$. Таким чином, ці технологічні умови можна вважати оптимальними для отримання кормової добавки на основі дріжджових клітинних стінок з високим вмістом β – глюканів.

Проведено два масштабних дослідження на провідних птахофабриках, щоб зрозуміти вплив добавки в раціонах бройлерів на етапі вирощування. Антибіотики були виключені з раціонів, а для порівняння використовували одну з відомих ринкових альтернатив у контрольній групі. Аналізуючи отримані дані можна дійти до висновку, що в обох групах введення даної кормової добавки призвело до підвищення середнього приросту маси тіла, збільшення середньої маси тіла відносно стандарту, відсотку виживання відносно стандарту та зниження рівня конверсії їжі.

Включення клітинних стінок дріжджів до раціону бройлерів, який не містить антибіотиків, покращило ефективність перетворення корму, зберігаючи при цьому оптимальне здорове травлення. Бройлери, які отримували цю добавку, продемонстрували вищий приріст ваги, що підтверджує її здатність підтримувати продуктивність росту без необхідності застосування антибіотиків. Це натуральне рішення підвищує продуктивність і відповідає сучасним тенденціям безантибіотичного птахівництва.

Висновки. Проведено аналіз сучасних досліджень щодо складу, властивостей та можливостей використання клітинних стінок дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Встановлено, що основними компонентами є β – глюкани, маннопротеїни та хітин, які визначають їхні біологічні та технологічні характеристики.

У ході експериментальних досліджень визначено оптимальні умови гідролізу для отримання клітинних стінок з високим вмістом біологічно

активних речовин. Найефективнішим виявився лужний гідроліз при рН = 10 з додаванням протеази, що забезпечив підвищення виходу β – глюканів до 62,6 %. Показано, що корекція кінцевого значення рН до 7,0 дозволяє отримати продукт, придатний для використання у кормових добавках, з покращеними фізико – хімічними властивостями та стабільністю. Результати випробувань на бройлерах підтвердили, що додавання клітинних стінок дріжджів до раціону сприяє підвищенню середнього приросту маси тіла, виживанню та зниженню конверсії корму. Це свідчить про позитивний вплив β – глюканів і маннаноолігосахаридів на імунний статус і метаболічну активність птиці.

Встановлено, що клітинні стінки *S. cerevisiae* можуть бути використані як ефективна, екологічно безпечна та відновлювана сировина для виробництва кормових добавок, біосорбентів, медичних і фармацевтичних препаратів. Подальші дослідження доцільно спрямувати на вдосконалення методів екстракції β – глюканів і маннопротеїнів, а також на розширення промислових напрямів використання продуктів на основі клітинних стінок дріжджів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Utama GL, Oktaviani L, Balia RL, Rialita T. Potential Application of Yeast Cell Wall Biopolymers as Probiotic Encapsulants. *Polymers*. 2023;15(16):3481. <https://doi.org/10.3390/polym15163481>
2. Jofre FM, Queiroz SS, Sanchez DA, Arruda PV, Santos JCD, Felipe MDGA. Biotechnological potential of yeast cell wall: An overview. *Biotechnology progress*. 2024;40(6):e3491. <https://doi.org/10.1002/btpr.3491>
3. Inokuma K, Kitada Y, Bamba T. et al. Improving the functionality of surface – engineered yeast cells by altering the cell wall morphology of the host strain. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2021;105:5895–5904. <https://doi.org/10.1007/s00253 – 021 – 11440 – 6>
4. Zhang C, Chen H, Zhu Y, Zhang Y, Li X, Wang F. *Saccharomyces cerevisiae* cell surface display technology: Strategies for improvement and applications. *Front. Bioeng. Biotechnol*. 2022;10:1056804. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1056804>
5. Jian Fan et al. Multidimensional Optimization of *Saccharomyces cerevisiae* for Carotenoid Overproduction. *Biodesign Research*. 2024;10:6:0026. <http://doi.org/10.34133/bdr.0026>
6. Gu M, Pan S, Li Q, et al. Evaluation and compare of yeast B – glucan and carboxymethylglucan to improve the immunity and gut health of turbot fed diet containing 400 g kg¹ of soybean meal. *Aquaculture Reports*. 2021;21:100882. doi:10.1016/J.AQREP.2021.100882 <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100882>
7. He F, Xie C, Xu X. Hyaluronic acid – modified yeast β – glucan particles delivering doxorubicin for treatment of breast cancer. *Carbohydrate Polymers*. 2023 314:120907. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120907>
8. Salgado M, Santos F, Rodríguez – Rojo S, Reis RL, Duarte ARC, Cocero MJ. Development of barley and yeast β – glucan aerogels for drug delivery by supercritical fluids. *J CO₂ Util*. 2017;22:262 – 269. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2017.10.006>
9. Sousa P. Tavares – Valente D, Amorim M, Azevedo – Silva J, Pintado M, Fernandes J. β – Glucan extracts as high – value multifunctional ingredients for skin health: A review. *Carbohydr. Polym*. 2023;322:121329. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121329>
10. Nguela JM, Teuf O, Assuncao Bicca S, Vernhet A. Impact of manno – protein N – glycosyl phosphorylation and branching on the sorption of wine polyphenols by yeasts and

- yeast cell walls. *Food Chem.* 2023; 403:134326. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134326>
11. Sun X, Yan Z, Zhu T, et al. Effects on the color, taste, and anthocyanins stability of blueberry wine by different contents of mannoprotein. *Food Chem.* 2019;279:63 – 69. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.139>
 12. Zeng F, Lai M, Li Q, Zhang H, Chen Z, Gong S, Liu X, Liu B. Anti – oxidative and anti – aging effects of mannoprotein – rich yeast cell wall enzymatic hydrolysate by modulating gut microbiota and metabolites in *Caenorhabditis elegans*. *Food Res Int.* 2023 Aug;170:112753. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112753>
 13. Fernando LD, Widanage MCD, Penfield J, et al. Structural polymorphism of chitin and chitosan in fungal cell walls from solid – state NMR and principal component analysis. *Front Mol Biosci.* 2021;8:727053. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.727053>
 - Jayakumar R, Menon D, Manzoor K, Nair SV, Tamura H. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials – A short review. *Carbohydr Polym.* 2010;82(2):227 – 232. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.074>
 14. Shinu KP, John H, Gopalakrishnan J. Chitin/deacetylated chitin nano – composite film for effective adsorption of organic pollutant from aqueous solution. *Int J Biol Macromol.* 2023;242:125038. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125038>
 15. Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog Polym Sci.* 2006;31(7):603 – 632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
 16. Silva DF, Rosa H, Carvalho AFA, Oliva – Neto P. Immobilization of papain on chitin and chitosan and recycling of soluble enzyme for deflocculation of *Saccharomyces cerevisiae* from bioethanol distilleries. *Enzyme Res.* 2015;1:1 – 10. <https://doi.org/10.1155/2015/573721>
 17. Zang L, Qiu J, Wu X, Zhang W, Sakai E, Yi W. Preparation of magnetic chitosan nanoparticles as support for cellulase immobilization. *Ind Eng Chem Res.* 2014;53(9):3448 – 3454. <https://doi.org/10.1021/ie404072s>
 18. Chen J, Liu J, Chen B, et al. Effective biodegradation of chlorophenols, sulfonamides, and their mixtures by bacterial laccase immobilized on chitin. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2023;256:114856. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114856>
 19. Chauhan S, Thakur A. Chitosan – based biosensors – a comprehensive review. *Mater Today Proc.* 2023. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2023.01.123>
 20. Azad AK, Bhattacharya T, Hasnain MS, Tripathi G, Nayak AK. Chitin – and chitosan – based nanomaterials for therapeutic applications. In: Hasnain MS, Nayak AK, Aminabhavi TM, eds. *Polymeric Nanosystems: Theranostic Nanosystems.* 2023;1:173 – 205. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85656-0.00026-7>
 21. Dey S, Hasnain MS, Nayak AK. Chitosan nanocomposites for biomedical applications. In: Hasnain MS, Sarwar B, Nayak AK, eds. *Chitosan in Biomedical Applications.* 2022:111 – 138. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821058-1.00011-3>
 22. Jagga S, Hasnain MS, Nayak AK. Chitosan – based scaffolds in tissue engineering and regenerative medicine. In: Hasnain MS, Sarwar B, Nayak AK, eds. *Chitosan in Biomedical Applications.* 2022:329 – 354. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821058-1.00014-9>

1.8 БІОТЕХНОЛОГІЧНІ СТРАТЕГІЇ ЗАПОБІГАННЯ КОНТАМІНАЦІЇ ПИВОВАРНОГО ПРОЦЕСУ: ПРИЧИНИ ТА НАСЛІДКИ МІКРОБІОЛОГІЧНОГО ПСУВАННЯ ПИВА

Лич І.¹, Лич О.², Бабченко В.²

¹Національний університет харчових технологій, Україна

²Київський національний університет технологій і дизайну, Україна
innalych78@gmail.com

Основним завданням роботи було проаналізувати причини мікробного псування пива та охарактеризувати біотехнологічні стратегії запобігання контамінації пивоварного процесу, спрямовані на забезпечення мікробіологічної стабільності та високої якості продукції.

***Ключові слова:** пиво, мікробна контамінація, мікробіологічна стабільність, дикі дріжджі, молочнокислі бактерії, біоплівки, біотехнологічний моніторинг.*

Пиво є одним з найпопулярніших напоїв у світі, технологія виробництва якого поєднує традиційні підходи та сучасні біотехнологічні рішення. Незважаючи на високу мікробіологічну стабільність продукту, пов'язану з низьким рН, вмістом етанолу, сполуками хмелю та умовами анаеробізу, ризик контамінації залишається актуальним. Мікроорганізми, що потрапляють у пивоварний процес, можуть зумовлювати псування продукту, зміну органолептичних властивостей та зниження якості готового пива. Особливу небезпеку становлять дикі дріжджі, бактерії родів *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus* та *Megasphaera*, які здатні утворювати біоплівки та проявляти стійкість до дезінфекційних засобів.

Виявлення і контроль таких мікроорганізмів є важливою складовою біобезпеки виробництв. З огляду на це, сучасна пивоварна промисловість дедалі більше спирається на біотехнологічні методи моніторингу, ідентифікації та профілактики мікробного псування. Вивчення особливостей контамінації та впровадження ефективних біотехнологічних стратегій контролю сприятиме підвищенню якості та стабільності пива.

Викладення основних результатів досліджень

Пиво має високу мікробіологічну стабільність завдяки низькому рН та наявності етанолу, гірких сполук хмелю, високого рівня вуглекислого газу, низького рівня кисню та низької кількості легкозасвоєваних вуглеводів, таких як глюкоза та мальтоза. Крім того, етап нагрівання при 100°C під час виробництва суслу ефективно інактивує мікробіоту, що сприяють псуванню і яка накопичилися до цього етапу. Тим не менш, для зменшення ймовірності псування необхідні профілактичні заходи, такі як протоколи санітарії в пивоварні та пастеризація або стерильна фільтрація під час упаковки. Незважаючи на ці заходи, пиво все ще може бути зіпсоване мікроорганізмами. Ризик псування вищий у безалкогольному

пиві через низький вміст алкоголю та наявність вищого рівня легкозасвоюваних цукрів у цих продуктах.

У таблиці наведено основні етапи виробництва пива та види мікроорганізмів, які спричиняють псування пива. Бактерії, особливо деякі молочнокислі бактерії, вважаються найнебезпечнішими мікроорганізмами, що спричиняють псування пива на пивоварнях. Однак, дріжджі та гриби також псують пиво [1]. Детальна характеристика видів мікроорганізмів та процесів, на які вони можуть впливати, спричиняючи псування пива, наведена у таблиці 1.

Таблиця 1. Характеристика видів мікроорганізмів та їхнього впливу на псування пива

| Види мікроорганізмів/ Тип процесу | Гриби | Дріжджі | Бактерії |
|--------------------------------------|--|---|---|
| Від ячменю до солоду | <i>Absidia</i> <i>Aspergillus</i> <i>Alternaria</i> <i>Aureobasidium</i> <i>Fusarium</i> <i>Botrytis</i> <i>Cladosporium</i> <i>Epicoccum</i> <i>Penicillium</i> | <i>Candida</i> <i>Debaromyces</i> <i>Hansenula</i> <i>Hanseniaspora</i> <i>Rhodotorula</i> <i>Sporobolomyces</i> <i>Trichosporon</i> | <i>Acetobacteriaceae</i> <i>Alcaligenes</i> <i>Bacillus</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Flavobacterium</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Pseudomonas</i> |
| Сусло | – | <i>Saccharomyces</i> | <i>Enterobacteriaceae</i> |
| Інокуляція | – | <i>Saccharomyces</i> | <i>Obesumbacterium</i> <i>Rhanella aquatilis</i> |
| Бродіння | – | <i>Saccharomyces</i> | <i>Lactobacillus</i> <i>Pediococcus</i> |
| Кондиціонування та упаковка | – | <i>Saccharomyces</i> <i>Bretanomyces</i> <i>Candida</i> <i>Hansenula</i> <i>Hanseniaspora</i> <i>Pichia</i> <i>Schizosaccharomyces</i> <i>Torulopsis</i> | <i>Acetobacter</i> <i>Gluconobacter</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Megaspaera</i> <i>Micrococcus</i> <i>Pectinatus</i> <i>Pediococcus</i> <i>Selenomonas</i> <i>Zymomonas</i> <i>Zymophilus</i> |

Ступінь забруднення ячменю міцеліальними грибами та дріжджами залежить від місця вирощування (поля) та умов зберігання. Основними грибними забруднювачами на полі є види *Fusarium* та *Cladosporium*, тоді як типові гриби при неправильному зберіганні включають види *Aspergillus* та *Penicillium*. Такі гриби, як *Fusarium*, *Aspergillus* та *Penicillium*, здатні виробляти мікотоксини, які виживають у процесі пивоваріння. Тому визначено суворі стандарти якості щодо рівня мікотоксинів у солоді. Ріст мікроміцетів та диких дріжджів також може бути шкідливим для якості

солоду, конкуруючи із зародком солоду за кисень, тим самим перешкоджаючи його проростанню [2].

На великих пивоварнях пиво здебільшого виготовляється з використанням «чистих» дріжджів, а термін «дикі дріжджі» використовується для позначення будь – якого іншого штаму дріжджів. В основному дикі дріжджі псуєть пиво на пізніших стадіях, тобто під час виробництва сусла, інокуляції, бродіння, газування та пакування. Зокрема, *Saccharomyces* та *Brettanomyces*, які використовуються у виробництві пива, також є основними дріжджами, що псуєть пиво. Дикі дріжджі, що не належать до *Saccharomyces*, часто виділяються з пивоварних середовищ, це *Dekkera anomala* та *Dekkera bruxellensis*. *Dekkera* – це аскоспороутворювальний рід, а також телеоморфна форма роду *Brettanomyces*. *D. anomala* тепер включає *Brettanomyces claussenii*, тоді як *D. bruxellensis* наразі вважається синонімом *Brettanomyces intermedius*, *Brettanomyces lambicus* та *Brettanomyces schanderlii*. Рідше зустрічаються види, що не є *Saccharomyces*, що псуєть пиво, це *Brettanomyces custersianus* та *Brettanomyces nanus*. Статус *B. custersianus* як виду, що псує пиво, був невизначеним, оскільки більшість штамів *B. custersianus* були виділені з пива Vantu, алкогольного напою, виготовленого з солодового проса. Однак нещодавнє дослідження показало, що штами *B. custersianus* здатні псувати японське та німецьке пиво типу Pilsner і демонструють подібну здатність до псування пива, як і *D. bruxellensis*. Види *Dekkera/Brettanomyces* викликають сторонні присмаки в пиві, виробляючи оцтову кислоту, 4 – етилфенол та 4 – етилгваякол [3, 4].

Дикі дріжджі *Saccharomyces*, що спричиняють псування пива, зараз переважно складаються з трьох видів: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* та *Saccharomyces pastorianus*. Не випадково, що ці три види також використовуються для виробництва пива та інших алкогольних напоїв, і, якщо їх ненавмисно забруднено, вони можуть стати псувальниками пива. *S. cerevisiae* наразі включає види, що спричиняють псування пива, які раніше описувалися як *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces cratericus*, *Saccharomyces ellipsoideus*, *Saccharomyces logos* та *Saccharomyces willianus* [5].

Серед відомих шкідників пива роду *Saccharomyces* основним є *S. diastaticus*, яка характеризується супер – атенуювальними властивостями. Супер – атенуювальна активність *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* призводить до надмірного вироблення CO₂, що призводить до деформації або розриву упаковки продукту та потенційно може спричинити травми споживачам. Псування пива цими дріжджами проявляється бродінням залишкових вуглеводів, включаючи декстрини та крохмаль, утворенням фенольних сторонніх присмаків, а також утворенням каламуті та перерозрідження. Це призводить до збільшення відсотка алкоголю, надмірної карбонізації та ослаблення структури пива. Біоплівки, утворені *S. diastaticus*, мають високу стійкість до антибіотиків, дезінфікуючих засобів, ультрафіолетового випромінювання та висушування. Крім того ці ділянки

нелегко видаляються та деякі з них повторно колонізуються впродовж 2 – 12 год. Дані досліджень показують, що *S.diastaticus* та *B.bruxellensis* існують лише в змішаних біоплівках за наявності *Candida* та/або *Pichia*. Первинними колонізаторами поверхонь на пивоварних розливних заводах є грамнегативні бактерії, такі як *Pseudomonas spp.* На наступному етапі прилипають дріжджі (зокрема *Pichia anomala*, *Candida sake* та *Debaryomyces hansenii*). Подальше прилипання *S. diastaticus* та/або *B. bruxellensis* призведе до утворення біоплівки з потенціалом псування [3, 5].

Безалкогольне та слабоалкогольне ароматизоване пиво є мікробіологічно нестабільним через високий вміст цукру, що може збільшити кількість видів диких дріжджів, що спричиняють псування пива. *Saccharomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Alternaria*, *Hansenia*, *Wickerhamomyces* та *Cladosporium* були ідентифіковані в безалкогольному пиві перед пастеризацією. Два штами диких дріжджів, *T. cantarellii* та *Candida sojae*, виробляли пиво з органолептичними властивостями, подібними до комерційного лагера, що свідчить про те, що ці забруднювачі пива можна повторно використовувати для корисного бродіння пива, з особливим акцентом на слабоалкогольне пиво [1].

Отже, пиво має високу мікробіологічну стабільність завдяки низькому рН, етанолу, гірким сполукам хмелю, високому рівню CO₂ та низькому вмісту кисню і вуглеводів, але все ще схильне до псування дикими дріжджами та іншими мікроорганізмами. Міцеліальні гриби (*Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*) та дріжджі (*Saccharomyces*, *Brettanomyces*, *Dekkera*) є основними шкідниками, які викликають сторонні присмаки, каламутність і надмірну карбонізацію. Дикі дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* є особливо небезпечними через супер – атенувальну активність, що призводить до надмірного утворення CO₂, деформації упаковки та утворення біоплівок, стійких до дезінфекції. Безалкогольне пиво є більш вразливим до псування через вищий вміст цукрів, але деякі дріжджі (*T. cantarellii*, *Candida sojae*) можуть бути використані для корисного бродіння.

Бактеріальна контамінація як причина мікробіологічної нестабільності пива

Найчастіше бактерії, що спричиняють псування пива, належать до грампозитивних молочнокислих бактерій та грамнегативних оцтовокислих бактерій. Серед молочнокислих бактерій найчастіше виявлений та найважчий для усунення є *Lactobacillus brevis*, оскільки може зберігатися у виробничому середовищі також завдяки здатності деяких штамів утворювати біоплівки. Інші види *Lactobacillus*, що відносяться до *Lactobacillus lindneri*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus parabuchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus coryneformis*, *Lactobacillus malefermentans* та *Lactobacillus curvatus*, також були виявлені як менш поширені шкідники пива. Серед педіококів кілька видів були виявлені на пивоварнях, такі як *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus dextrinicus*, *Pediococcus inopinatus* та *Pediococcus parvulus*.

Pediococcus damnosus вважається основним видом, що псує пиво, разом із, хоча й меншою мірою, *Pediococcus dextrinicus* та *Pediococcus inopinatus*. Ріст цих бактерій під час процесу пивоваріння передбачає конкуренцію за поживні речовини з дріжджами, що призводить до зниження ферментації дріжджів і, отже, до зниження виходу етанолу. Також псування пива може спричиняти *Staphylococcus xylosus* – це мікроорганізм зі шкіри людей або тварин, а також поширена бактерія, яка природним чином присутня в харчових продуктах або сировині. Штам *S. xylosus* був виділений з комерційно каламутного та неприємного на смак крафтового пива, яке було відкликано з місцевого ринку пивоварнями. Цей штам здатний добре рости в присутності хмелевих сполук і демонстрував сильну здатність псувати пиво. Загальна характеристика можливих бактерій, які спричиняють псування пива, представлена у таблиці 2 [6, 7].

Таблиця 2. Характеристика бактеріальних контамінантів пива

| Тип пива | Збудник забруднення | Метод визначення | Характеристика забрудненого пива | Посилання на літературу |
|---------------|-------------------------------|---|--|-------------------------|
| Лагерне пиво | <i>P.damnokus</i> | Мас – спектрометрія (MALDI – TOF MS) | Кисле пиво: утворення діацетилу та молочної кислоти, зниження стабільності піни, утворення осаду | [8] |
| | <i>L.backii</i> | | Підкислене пиво | |
| | <i>L.paracollinoides</i> | | | |
| | <i>L.lindneri</i> | | | |
| | <i>L.brevis</i> | | | |
| | <i>Pediococcus claussenii</i> | RT – qPCR аналіз | Несприятливий сенсорний профіль | [9] |
| Крафтове пиво | <i>L.brevis</i> | Метод культивування на чашках з каталазою | Помутніння та кислий смак пива через виділення молочної та оцтової кислоти | [8, 10] |
| | <i>L.planatrum</i> | | | |
| | <i>L.acetotolerans</i> | | | |
| | <i>P.damnokus</i> | | | |
| Драфтове пиво | <i>Staphylococcus xylosus</i> | Агарові пластинки | Каламутність пива: органічні кислоти та біогенні аміни | [11] |
| | <i>B.cereus</i> | Метод культивування на чашках | Каламутність пива, зміни смаку пива | |

Облігатні анаероби, що спричиняють псування пива, переважно складаються з двох родів: *Pectinatus* та *Megasphaera*, що виробляють різні сполуки стороннього присмаку, такі як H₂S та коротколанцюгові жирні кислоти, які роблять забруднене пиво особливо неприємним. Повідомлялося, що ці строго анаеробні бактерії псування пива росли в пиві з вмістом менше 0,3 мг/л розчиненого кисню. Фактично, вміст розчиненого кисню в пиві значно знизився за останні роки разом із прогресом у технології пивоваріння та пакування, яка має на меті покращити хімічну

стабільність пива. Ці технологічні досягнення, здається, сприяли появі анаеробних бактерій, що псують пиво, як одного з серйозних контамінантів пива, а саме *Pectinatus frisingensis* разом з іншими близькоспорідненими видами, *Selenomonas lactificifex*, *Propionispira (Zymophilus) raffinovorans* та *Propionispira (Zymophilus) paucivorans*. Зазначалося, що *Selenomonas lactificifex* має відносно сильний потенціал псування пива та росте в пиві зі значенням рН 4,3 – 4,6, що робить цей вид облігатним псувальником пива. З іншого боку, було виявлено, що два інші види *Propionispira (Zymophilus)* не ростуть у пиві зі значенням рН 4,6. Статус *Selenomonas* та *Propionispira (Zymophilus)* як псувальників пива не був чітко встановлений через відсутність статистичних досліджень щодо фактичних випадків псування пива, пов'язаних з їхньою діяльністю. У 2004 році *Pectinatus portalensis* був запропонований як новий вид, що демонструє здатність до псування пива та вина. У 2006 році були запропоновані *Pectinatus haikarae*, *Megasphaera paucivorans* та *Megasphaera sueciensis*. Штами, що належать до цих трьох нових видів, були виділені з європейського пива, що становить нову загрозу для пивоварної промисловості. Неофіційна інформація від європейських пивоварів вказує на те, що *Pectinatus* та *Megasphaera* були основними псувальниками пива.

Найновішим доповненням до облігатних анаеробних бактерій псування пива, була *Prevotella cerevisiae*, запропонована у 2019 році. Цей вид був виділений зі стічних вод пивоварні, і профілі росту в пиві з різним рівнем рН виявилися подібними до профілів інших строго анаеробних бактерій, таких як *Pectinatus frisingensis* та *Megasphaera cerevisiae*. Поява нового роду псування пива була досить несподіваною для пивоварної промисловості, і очікується, що в майбутньому з'являться нові види та роди анаеробних псувальників пива [12, 13].

Сучасна профілактика мікробіологічного псування пива спирається на комплекс біотехнологічних підходів, що поєднують превентивні заходи, швидку діагностику та фізико – хімічні бар'єри. Першим рівнем захисту є суворі програми санітарії та контролю середовища (СІР, контроль повітряних потоків, стерилізація ліній), які значно знижують ризик формування біоплівки і повторних вогнищ контамінації. Для раннього виявлення контамінації впроваджують молекулярні методи – qPCR/RT – qPCR [18] та таргетні ПЛР – тести – що дозволяють виявляти навіть невеликі популяції «псувальників», включно з VBNC – формами бактерій [14, 15]. Мас – спектрометрія (MALDI – TOF) і високопродуктивне секвенування (NGS/WGS) використовуються для швидкої ідентифікації штамів та відстеження джерел забруднення в масштабі виробництва [16, 17].

Для кінцевої стабілізації продукту застосовують пастеризацію або стерильну/ультрафільтрацію при розливі, а для свіжих нефільтрованих сортів – контроль за технологічним киснем і строгий мікробіологічний моніторинг. Використання молекул хмелю з антибактеріальними властивостями, оптимізація складу суслу та вибір «чистих» інокулюмів дріжджів зменшують конкурентні ризики від диких дріжджів. Нові

біосенсори та портативні системи швидкого скринінгу дозволяють вбудувати онлайн – моніторинг у технологічний процес і скоротити час реакції при виявленні відхилень [19].

Для боротьби з біоплівками ефективні комбіновані підходи – ферментні засоби для руйнування матриці біоплівки разом із цільовою хімією та механічною обробкою важкодоступних частин обладнання. Важливою частиною стратегії є система управління ризиками (НАССР, лабораторний менеджмент) та навчання персоналу, оскільки людський фактор часто є джерелом крос – контамінації. Комплексне застосування цих біотехнологічних методів забезпечує оперативне виявлення, локалізацію та усунення контамінацій, що підвищує стабільність, безпеку та якість пивної продукції.

Висновки. Отже, основними бактеріальними контамінантами пива є грампозитивні молочнокислі бактерії (*Lactobacillus brevis*, *Pediococcus damnosus*) та грамнегативні оцтовокислі бактерії, які викликають помутніння, кислий смак і зниження стабільності піни. Анаеробні бактерії (*Pectinatus*, *Megasphaera*, *Selenomonas*, *Prevotella*) стають дедалі серйознішими контамінантами через низький рівень кисню в сучасному пиві, виробляючи H_2S та жирні кислоти, що погіршують смак. Бактерії, такі як *Staphylococcus xylosus*, можуть забруднювати крафтове пиво, викликаючи каламутність і неприємний смак. Нові види бактерій (*Pectinatus haikarae*, *Megasphaera sueciensis*, *Prevotella cerevisiae*) створюють нові виклики для пивоварної промисловості, що вимагає вдосконалення методів контролю та моніторингу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Suiker, I. M., Arkesteijn, G. J. A., Zeegers, P. J., & Wösten, H. A. B. (2021). Presence of *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *diastaticus* in industry and nature and spoilage capacity of its vegetative cells and ascospores. *International Journal of Food Microbiology*, 347, Article 109147. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109147>
2. Bokulich, N. A., & Bamforth, C. W. (2013). The microbiology of malting and brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(2), 157 – 172. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00060-12>
3. Latorre, M., Hutzler, M., Michel, M., Zarnkow, M., Jacob, F., & Libkind, D. (2020). Genotypic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* spoilers in a community of craft microbreweries. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, 73(3 – 4), 51 – 57.
4. Colomer, M. S., Funch, B., & Forster, J. (2019). The raise of *Brettanomyces* yeast species for beer production. *Current Opinion in Biotechnology*, 56, 30 – 35. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.07.009>
5. Meier – Dörnberg, T., Jacob, F., Michel, M., & Hutzler, M. (2017). Incidence of *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* in the beverage industry: Cases of contamination, 2008 – 2017. *Technical Quarterly of the Master Brewers Association of the Americas*, 54(3), 140 – 148. <https://doi.org/10.1094/TQ-54-3-0717-01>
6. Geissler, A. J., Behr, J., von Kamp, K., & Vogel, R. F. (2016). Metabolic strategies of beer spoilage lactic acid bacteria in beer. *International Journal of Food Microbiology*, 216, 60 – 68. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.016>

7. Wang, Z., Chao, Y. (2020) Formation of viable, but putatively non – culturable (VPNC) cells of beer – spoilage lactobacilli growing in biofilms. *LWT*, 133 (12). doi:10.1016/j.lwt.2020.109964
8. Villa, K., Vyskočil, J., Ying, Y., Zelenka, J., & Pumera, M. (2020). Microrobots in brewery: Dual magnetic/light – powered hybrid microrobots for preventing microbial contamination in beer. *Chemistry*, 26(14), 3039 – 3043. <https://doi.org/10.1002/chem.202000162>
9. Visciano, P., & Schirone, M. (2022). Update on Biogenic Amines in Fermented and Non – Fermented Beverages. *Foods*, 11(3), 353. <https://doi.org/10.3390/foods11030353>
10. Deng, Y., Ju, J. (2014) An improved plate culture procedure for the rapid detection of beer – spoilage lactic acid bacteria. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(2), 127 – 132.
11. Wray, E. Common faults in beer. (2020) In *The Craft Brewing Handbook*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands. – P. 217 – 246.
12. Wagner, E. M., Thalgueter, S., Wagner, M., & Rychli, K. (2021). Presence of microbial contamination and biofilms at a beer can filling production line. *Journal of Food Protection*, 84(5), 896 – 902. <https://doi.org/10.4315/JFP-20-368>
13. Rodríguez – Saavedra, M., González de Llano, D., & Moreno – Arribas, M. V. (2020). Beer spoilage lactic acid bacteria from craft brewery microbiota: Microbiological quality and food safety. *Food Research International*, V. 138 (Pt A), Article 109762. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109762>
14. Oldham R.C. et al. Methods for detection and identification of beer – spoilage microbes. (2023) *Front Microbiol*, V. 14: 1217704. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7346571>
15. Suzuki K. Microbiological instability of beer caused by spoilage microorganisms. (2011) *J. Inst. Brew.* 1117 (2). P. 131 – 155. https://cibd.fem.jp/pdf/beer_micro.pdf
16. Ciont G. et al. Beer Safety: New Challenges and Future Trends within Brewing Industry. (2022), *Foods*, V. 11 (17). 2693. <https://www.mdpi.com/2306-5710/8/2/33>
17. Wieme A.D. et al. Identification of beer – spoilage bacteria using matrix – assisted laser desorption/ionization time – of – flight mass spectrometry. (2014), *International Journal of Food Microbiology*, V. 185. P. 41 – 50. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2014-0909-01>
18. Nesterova E. et al. Molecular Methods for Detecting Microorganisms in Beverages. (2024), *Beverages*. 10(2), 46. <https://doi.org/10.3390/beverages10020046>
19. Benadouda K. et al. Current State of Sensors and Sensing Systems Utilized in Beverage Monitoring. (2023), 9(1), 5. <https://www.mdpi.com/1424-8220/23/4/1872>

1.9 АНТИБАКТЕРІАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ КОМПЛЕКСУ ВИСОКОМОЛЕКУЛЯРНИХ БІЛКІВ КОЗИНОГО МОЛОЗИВА

Лич І.¹, Єгорова К.¹, Волошина І.²

¹Національний університет харчових технологій, Україна

²Київський національний університет технологій і дизайну, Україна
innalych78@gmail.com

Основним завданням даної роботи було дослідження антибактеріальної активності високомолекулярних білкових фрагментів козиного молозива та вивчення їх взаємодії з лікарськими засобами – парацетамолом, метамізолом натрію і мелоксикамом – для встановлення можливості створення комбінованих препаратів із підвищеною антимікробною ефективністю та зниженим рівнем побічних ефектів.

Ключові слова: *козине молозиво, високомолекулярні білки, антимікробна активність, мінімальна інгібувальна концентрація, синергійний ефект.*

Впродовж останніх років проблема розвитку резистентності патогенних мікроорганізмів до антибіотиків набула глобального характеру [1]. Тому для боротьби з інфекційними агентами є необхідним пошук та розробка нового антибактеріального препарату з високою антимікробною активністю і низьким ризиком виникнення стійкості. Перспективною альтернативою антибіотикам є природні антимікробні речовини, серед яких відзначається молозиво кіз, що містить комплекс біологічно активних високомолекулярних білків, які володіють протимікробними властивостями. Високомолекулярні білки молозива менш токсичні, не чинять побічних реакцій на організм, а також швидко розпадаються і не накопичуються в організмі [2].

Молозиво – унікальний природний продукт, до складу якого входять сполуки різної природи, які забезпечують захист імунної системи новонароджених, а також захищають організм від інфекційних збудників [3]. У порівнянні з коров'ячим молозивом, козине є більш цінним, оскільки воно містить у два рази більше імуноглобулінів G, вищий рівень лактоферину та факторів росту [3, 4]. А також воно краще засвоюється, та містить на 33% менше білку α_{s1} – казеїну, який утворює в шлунку тверді згустки, які можуть спричинити алергічні реакції та проблеми з травленням у немовлят [5].

Молозиво кіз містить біоактивні пептиди та білки, що мають антибактеріальну активність проти широкого спектру мікроорганізмів. До них належать, насамперед, лактоферин, лізоцим та лактопероксидазу [3,6]. Антибактеріальна активність лактоферину спостерігається як проти грамнегативних, так і грампозитивних бактерій. Вона пов'язана зі здатністю лактоферину до порушення мембран мікроорганізмів і

зв'язуванням заліза, яке є необхідним для росту бактерій. Бактерицидна активність лактопероксидази пов'язана з окисненням тіоціанату в присутності перекису водню [7]. Антимікробна активність білків молозива здебільшого зумовлена інгібуванням синтезу клітинної стінки бактерій, що здійснюється завдяки запобіганню реакції транспептидації – завершального етапу синтезу клітинної стінки [8].

З літературних джерел відомо, що казеїновий білок CSN1S2 молозива кіз інгібує ріст грампозитивних (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* і *Bacillus cereus*) і грамнегативних бактерій (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi* та *Shigella flexneri*) [9], пептиди, отримані шляхом гідролізу білків козиного молока та молозива, володіють антимікробними властивостями проти грампозитивних (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*, *B. subtilis*) та грамнегативних бактерій (*E. coli*, *S. typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*) [8, 10, 11, 12], а сироваткові білкові фракції молозива кіз мають антимікробну дію щодо *S. aureus*, *P. aeruginosa* та *E. coli* [7].

Отже, молозиво кіз характеризується наявністю комплексу сполук, які здатні знищувати широкий спектр патогенних мікроорганізмів, тим самим допомагаючи організму протистояти інфекційним захворюванням.

Крім цього, перспективним напрямом є створення на основі білкових фрагментів молозива кіз комбінованих препаратів з лікарськими речовинами, що володіють антибактеріальними, знеболювальними, жарознижувальними та протизапальними властивостями. У клінічній практиці у якості засобів з перерахованими властивостями переважно застосовують нестероїдні протизапальні препарати. Однак ці засоби часто викликають побічні явища, такі як гастро – інтестинальні порушення, виникнення ускладнень з боку серцево – судинної системи, зниження клубочкової фільтрації і діурезу, підвищення артеріального тиску, бронхоспазм, жовтяницю, головний біль, головокружіння, підвищену втомлюваність та інші [13, 14].

Особливо небезпечними нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП) є для дітей. ВООЗ офіційно визнає тільки ібупрофен і парацетамол в якості надійних та безпечних для дітей НПЗП, які повністю відповідають критеріям безпеки і ефективності в педіатричній практиці і рекомендує їх застосування у дітей [13]. Крім цього, можливе обмежене застосування для дітей такого препарату, як метамізол натрію (анальгін) – при гіпертермії внутрішньовенно або внутрішньом'язово у вигляді 50% розчину [15], а також препаратів, таких як толметин, напроксен, мелоксикам, целекоксиб [14].

На сьогоднішній день у літературі немає даних щодо визначення антибактеріальних властивостей молозива кіз в комбінації з лікарськими препаратами, проте раніше нами було досліджено антибактеріальні властивості біологічно активних білкових фрагментів молозива корів у суміші з лікарським препаратом ібупрофен, та встановлено, що мінімальні інгібувальні концентрації комбінованого препарату є значно нижчими, ніж білкових фрагментів молозива та ібупрофену окремо [16].

Тому наші дослідження дадуть змогу визначити характер взаємодії білків козиного молозива з лікарськими препаратами та оцінити доцільність створення комбінованих препаратів з метою зниження побічних ефектів при застосуванні нестероїдних лікарських речовин, особливо у дітей першого року після народження. Для досліджень були обрані такі лікарські препарати як парацетамол, метамізол натрію та мелоксикам, зважаючи на найбільшу безпечність для організму дітей.

Мета роботи. Дослідити антибактеріальну дію біологічно активних білкових фрагментів молозива кіз, вивчити протимікробні властивості білків козиного молозива у поєднанні з лікарськими засобами – парацетамолом, метамізолом натрію та мелоксикамом.

Матеріали і методи дослідження

Об'єктом дослідження слугувало молозиво кіз, яке було відібрано через 2, 12 та 24 години після окоту.

Дослідження антибактеріальних властивостей біологічно активних білкових фрагментів молозива кіз проводили за показником мінімально інгібувальної концентрації (МІК), використовуючи метод серійних поступових двократних розведень у м'ясо – пептонному бульйоні (МПБ) [17]. Як тест – культури використовували бактерії *Escherichia coli* ІЕМ – 1, *Staphylococcus aureus* БМС – 1, *Bacillus subtilis* БТ – 2, *B. cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus flavus* та дріжджі *Candida albicans* Д – 6, *C. tropicalis* РЕ – 2, *C. utilis* БВС – 65.

Результати оцінювали візуально по помутнінню середовища: (+) – пробірки, де спостерігалось помутніння середовища, (–) – помутніння було відсутнє.

Для визначення синергічної дії між білками молозива кіз та лікарськими речовинами використовували техніку шахової дошки [18]. В стерильних умовах у лунки першого планшета вносили по 0,1 мл середовища МПБ. У перший ряд лунок (А1...А8) вносили 0,1 мл розчину білків молозива, після чого перемішували, проводили ряд послідовних серійних розведень у восьми паралельних рядах. Таким чином, концентрація розчину білків у кожній наступній лунці знижувалася у 2 рази. Останній ряд лунок (Н1...Н8) використовувався як контроль без додавання препарату.

Аналогічно у лунки другого планшета вносили по 0,1 мл середовища МПБ. У вертикальний ряд лунок (А8...Н8) вносили 0,1 мл розчину лікарської речовини, після чого перемішували проводили ряд послідовних серійних розведень у восьми паралелях. Таким чином, концентрація розчину лікарської речовини у кожній наступній лунці знижувалася у 2 рази. Останній ряд лунок (А1...Н1) використовувався як контроль без додавання препарату.

Далі вміст лунок з лікарською речовиною з другого планшета переносили у відповідні лунки з молозивом першого планшета. Потім суспензію тест – культури вносили по 0,01 мл у кожен з лунок. Планшети

інкубували впродовж 24 год при оптимальній температурі для відповідної тест – культури.

Результати оцінювали візуально по помутнінню середовища: (+) – лунки, де спостерігалось помутніння середовища, (–) – помутніння було відсутнє.

Для визначення результатів у ряді лунок А1...Н1 визначали МІК білків молозива, а у ряді лунок Н1...Н8 визначали МІК лікарської речовини.

Далі визначали МІК білків молозива у присутності лікарської речовини і МІК лікарської речовини у присутності білків молозива. Визначення МІК проводили по першій прозорій лунці ряду, яка входить у діагональ А8 – В7 – С6 – D5 – Е4 – F3 – G2 – Н1, чи лунках, які знаходяться безпосередньо біля однієї з лунок цієї діагоналі.

Потім розраховували індекс фракційної інгібуючої концентрації (ФІК):

$$\text{ФІК} = \text{МІК}_{\text{АБ}} / \text{МІК}_{\text{А}} + \text{МІК}_{\text{БА}} / \text{МІК}_{\text{Б}}$$

$\text{МІК}_{\text{А}}$ – МІК білків молозива;

$\text{МІК}_{\text{Б}}$ – МІК лікарської речовини;

$\text{МІК}_{\text{АБ}}$ – МІК білків молозива у присутності лікарської речовини;

$\text{МІК}_{\text{БА}}$ – МІК лікарської речовини у присутності білків молозива.

Результати та обговорення

Антимікробні властивості білкових фрагментів молозива кіз, визначені за показником мінімальної інгібувальної концентрації (МІК), наведено у табл. 1.

Таблиця 1. Антибактеріальні властивості високомолекулярних білків козиного молозива

| Тест – культура | МІК, мкг/мл | | |
|---------------------------|------------------------------------|--------|--------|
| | Білки молозива, відібраного через: | | |
| | 2 год | 12 год | 24 год |
| <i>E. coli</i> ІЕМ – 1 | 78 | 156 | 156 |
| <i>B. subtilis</i> БТ – 2 | 78 | 78 | 156 |
| <i>S. aureus</i> БМС – 1 | 156 | 312 | 312 |
| <i>B. cereus</i> | 78 | 156 | 156 |
| <i>M. flavus</i> | 156 | 312 | 312 |
| <i>P. aeruginosa</i> | 312 | 625 | 625 |

З результатів, представлених у табл. 1, видно, що найменші МІК виявляють білки молозива кіз, відібраного через 2 години після окоту. Високомолекулярні білки козиного молозива проявляють найбільшу антимікробну активність щодо *B. subtilis* БТ – 2, *B. cereus* та *E. coli* ІЕМ – 1, МІК яких становить 78 мкг/мл. МІК щодо *S. aureus* БМС – 1 та *M. flavus* є вищими – 156 мкг/мл. Найменше інгібування білки молозива кіз проявляють щодо *P. aeruginosa* (МІК становить 312 мкг/мл).

Дріжджі роду *Candida* (*Candida albicans* Д – 6, *C. tropicalis* PE – 2, *C. utilis* БВС – 65) виявилися нечутливими до білкових фрагментів молозива кіз.

Отже, отримані дані підтверджують чутливість бактеріальних штамів до дії білків козиного молозива, тому вони можуть бути ефективними в лікуванні бактеріальних інфекцій.

На наступному етапі нашої роботи ми дослідили взаємодію лікарських засобів з білками молозива. Для дослідження використовували білки козиного молозива, відібраного через 2 години після окоту. Для характеристики спільної антимікробної дії білків молозива та лікарських речовин розраховували індекс ФІК (табл. 2). Якщо індекс ФІК становить 0,5 або менше – ефект синергічний; між 0,5 і 1 – адитивний. Індекс ФІК між 1 і 2 означає нейтральний ефект, а показник ФІК більше 2 означає антагонізм.

Таблиця 2. Мінімальні інгібувальні концентрації білків молозива, лікарських препаратів та їх суміші та фракційна інгібувальна концентрація суміші препаратів

| Препарат | Тест культура | МІК, мкг/мл | | | | ФІК |
|------------------|--------------------|-------------|-----------|---------------------------------|----------------------------------|------|
| | | Молозива | Препарату | Молозива в суміші з препаратом* | Препарату в суміші з молозивом** | |
| Мелоксикам | <i>E. coli</i> | 78 | 625 | 39 | 78 | 0,62 |
| | <i>B. subtilis</i> | 78 | 312 | 78 | 312 | 2 |
| | <i>B. cereus</i> | 78 | 312 | 39 | 156 | 1 |
| Метамізол натрію | <i>E. coli</i> | 78 | 625 | 19 | 156 | 0,49 |
| | <i>B. subtilis</i> | 78 | 1250 | 19 | 39 | 0,27 |
| | <i>B. cereus</i> | 78 | 78 | 19 | 19 | 0,49 |
| Парацетамол | <i>E. coli</i> | 78 | 1250 | 19 | 78 | 0,31 |
| | <i>B. subtilis</i> | 78 | 312 | 19 | 39 | 0,37 |
| | <i>B. cereus</i> | 78 | 625 | 19 | 78 | 0,37 |

Примітка: * – МІК визначали за концентрацією білків молозива у першій прозорій лунці ряду, яка входить у діагональ А8 – В7 – С6 – D5 – E4 – F3 – G2 – H1, чи лунці, які знаходяться безпосередньо біля однієї з лунок цієї діагоналі; ** – МІК визначали за концентрацією лікарського препарату у першій прозорій лунці ряду, яка входить у діагональ А8 – В7 – С6 – D5 – E4 – F3 – G2 – H1, чи лунці, які знаходяться безпосередньо біля однієї з лунок цієї діагоналі.

Отже, суміш мелоксикаму з білками молозива щодо *E. coli* та *B. cereus* проявляє адитивний ефект (показник ФІК становить 0,62 та 1 відповідно), а щодо *B. subtilis* – нейтральний ефект (ФІК = 2). При взаємодії парацетамолу з молозивом щодо *E. coli*, *B. subtilis* та *B. cereus* спостерігається синергічний ефект (ФІК = 0,31, 0,37 та 0,37 відповідно). Суміш метамізолу натрію з білками молозива проявляє синергічний ефект щодо *E. coli*, *B. subtilis* та *B. cereus* (ФІК становить 0,49, 0,27 та 0,49 відповідно).

Тому створення комбінованих препаратів білків молозива з метамізолом натрію та парацетамолом є доцільним, оскільки це дозволить знизити терапевтичну дозу даних лікарських засобів, та відповідно їхні побічні ефекти, тому отримані препарати будуть більш безпечними для організму дитини.

Висновки. Таким чином, в результаті наших досліджень підтверджено чутливість бактерій до білкових фрагментів молозива кіз, а також визначено, що високомолекулярні білки козиного молозива у комбінації з метамізолом натрію та парацетамолом демонструють синергічний ефект, тому доцільним є створення протимікробних та протизапальних препаратів на основі біологічно активних білків козиного молозива у комбінації з наведеними лікарськими речовинами, які не викликають побічних реакцій, та до яких не буде формуватися резистентність.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕТЕЛ

1. Бондар М.В., Пилипенко М.М., Свінтуковський М.Ю., Харченко Л.А., Превисла О.М., Цвик І.М. Антибіотикорезистентність мікроорганізмів: механізми розвитку й шляхи запобігання. Медицина неотложных состояний. 2016; 3(74): 11 – 17. <https://cyberleninka.ru/article/n/antibiotikorezistentnist-mikroorganizmiv-mehanizmi-rozvitku-y-shlyahi-zapobigannya>
2. Шевченко Т.В., Лобода О.І. Біологічна цінність і перспективи використання козиного молока і молозива // Вісник аграрної науки. – 2022. – №11. – С.112 – 118.
3. Voloshyna, I. Practical use of goat milk and colostrum / I.M. Voloshyna, K.I. Soloshenko, I.V. Lych, L.V. Shkotova // *Biotechnologia acta*. – 2021. – V. 14 – № 5. – P. 38 – 48. <https://doi.org/10.15407/biotech14.05.038>
4. Зажарська Н. М., Самойленко Ю. В. Хімічні та імунологічні показники козиного молозива і молока залежно від періоду лактації. Вісник Дніпропетровського державного аграрно – економічного університету. 2016; 2(40): 70 – 75.
5. Biadała A., Konieczny P. Goat's milk – derived bioactive components. *Mljekarstvo*. 2018, 68(4): 239 – 253. doi: 10.15567/mljekarstvo.2018.0401.
6. Rashid A.A., Yousaf M., Salaryia A.M., Ali S. Studies on the nutritional composition of goat (Beetal) colostrum and its mature milk. *Pak. J. Biochem. Mol. Biol.* 2012; 45(3): 113 – 116.
7. Medeiros G.K.V.V., Queiroga R.C.R.E., Costa W.K.A., Gadelha C.A.A., Lacerda R.R., Lacerda J.T.J.G., Pinto L.S., Braganhol E., Teixeira F.C., Barbosa P.P.S., Campos M.I.F., Gonçalves G.F., Pessôa H.L.F., Gadelha T.S. Proteomic of goat milk whey and its bacteriostatic and antitumour potential. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018, 113: 116 – 123. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.01.20
8. Osman A., Goda H.A., Abdel – Hamid M., Badran S.M., et. al. Antibacterial peptides generated by Alcalase hydrolysis of goat whey. *LWT – Food Sci. Technol.* 2016, 65: 480 – 486. doi:10.1016/j.lwt.2015.08.043
9. Triprisila L.F., Suharjo A.C., Fatchiyah F. The comparing of antimicrobial activity of CSN1S2 protein of fresh milk and yoghurt goat breed ethawah inhibited the pathogenic bacteria. *Materia socio – medica*, 2016; 28(4): 244 – 248. doi: 10.5455/msm.2016.28.244 – 248
10. Esmailpour M., Ehsani M. R., Aminlari M., Shekarforoush Sh., et. al. Antimicrobial peptides derived from goat's milk whey proteins obtained by enzymatic hydrolysis. *J. Food Biosci. technol.* 2017, 7 (1): 65 – 72.

11. Kusumaningtyas E., Widiastuti R., Kusumaningrum H.D., Suhartono M.T. Antimicrobial and antioxidative activities of peptides from goat milk hydrolyzed with various protease. *JITV*. 2015, 20 (3): 175 – 183. doi: 10.14334/jitv.v20i3.1184
12. Lestari P., Suyata Antibacterial activity of hydrolysate protein from Etawa goat milk hydrolysed by crude extract bromelain IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng. 2019, 509. doi:10.1088/1757 – 899X/509/1/012111.
13. Златкіна В.В., Ринденко Т.С. Патогенетичне обґрунтування несприятливих ефектів нестероїдних протизапальних засобів та особливості застосування у пацієнтів різних вікових груп. *Український журнал медицини, біології та спорту*, 2018; 3(5): 221 – 230.
14. Рейтмаєр М.Й. Проблемні питання щодо використання нестероїдних протизапальних лікарських засобів у дитячій ревматологічній практиці. *Галицький лікарський вісник*. 2013; 20 (1): 6 – 9.
15. Викторов А.П. Фармакотерапия нестероидными противовоспалительными средствами при повышенной температуре тела и лихорадке. *Рациональная фармакотерапия*. 2009; 1(10): 30 – 35.
16. Лич І.В., Моцар А.В., Солошенко К.І. Імуномодулювальні та антибактеріальні властивості препарату на основі біологічно активних білкових фрагментів молозива. *Наукові праці НУХТ*. 2019; 25(3): 49 – 58
17. Mazzola P., Jozala A., Lencastre – Novaes L., Moriel P., Vessoni – Penna T. Minimal inhibitory concentration (MIC) determination of disinfectant and/or sterilizing agents. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2009; 45 (2): 241–248. doi: 10.1590/S1984 – 82502009000200008
18. Тапальский Д.В. Методы определения чувствительности к комбинациям антибиотиков грамотрицательных бактерий с экстремальной и полной антибиотикорезистентностью : инструкция по применению / Д.В. Тапальский, Л.В. Лагун. – Гомель. – 2017. – 27 с. – Режим доступа: <http://elib.gsmu.by/handle/GomSMU/3627>

1.10 ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ВЕГЕТАТИВНИХ ДОБАВОК НА БІОМЕТАНОГЕНЕЗ

Маріїн Д. В., Сакалова Г. В.

Вінницький національний технологічний університет, Україна
sakalova@vntu.edu.ua

Дослідження проводили з метою отримання нових даних щодо ефективного метаногенезу при збродженні відходів цукрового виробництва з додаванням лігноцелюлозної сировини. Як сировину використовували сільськогосподарські культури амаранту різних сортів. Після аналізу компонентного складу амаранту свіжого вмісту та сухої сировини за стандартними методиками, зразки піддавали мікробіологічній обробці в присутності ферментного препарату в лабораторній і промислових умовах. Визначено, що при використанні вегетативної маси рослин амаранту з відходами цукрового виробництва у процесах метаногенезу збільшується вихід біогазу та його калорійність.

Ключові слова: біогаз, метан, метаногенез, амарант.

Важливим вектором розвитку відновлюваної енергетики вважається отримання біогазу з органічних залишків, які надходять із сільського господарства. Потенціал України з точки зору виробництва біопалива величезний, оскільки країна має добре розвинену агропромисловість, залишки якої створюють достатню сировинну базу. Таким чином, енергія, отримана з біомаси, може стати відчутною заміною викопному паливу[1].

Враховуючи європейський досвід, а також потенціал і потреби України у енергоресурсах, необхідність будівництва біогазових установок передбачає три основні чинники:

- отримання джерел енергії
- реалізацію сільськогосподарської продукції та побічних продуктів виробництва біогазу
- управління екологічними проблемами.

Отже, розвиток відновлюваної енергетики, зокрема виробництва біогазу, має вирішальне значення для забезпечення енергетичної безпеки України в умовах війни.

Все більша увага у світі приділяється використанню біовідходів для виробництва біогазу шляхом анаеробного збродження [2, 3]. Актуальність розвитку цієї технології, як і інших технологій виробництва екологічних енергоресурсів, не підлягає сумніву, оскільки споживання енергії постійно зростає, що вимагатиме збільшення виробництва різних видів енергоносіїв.

В сільськогосподарських регіонах експлуатація біогазових установок набуває широкого поширення. Такі установки вводять в експлуатації, як

правило, в межах агропромислового комплексу, з близьким розташуванням комплексів відгодівлі худоби, або ж підприємств переробки продуктів рослинництва, молокозаводів, спирто – горілчаних підприємств, тощо.

У процес метанової ферментації можна вводити багато видів матеріалів, так званих субстратів:

1. Біомаса та відходи сільського господарства:

- гній та гнойова рідина;
- пожнивні залишки (наприклад, солома, сіно, лушпиння, листя);
- силос (наприклад, кукурудзяний, трав'яний);
- енергетичні рослини (наприклад, сорго).

2. Промислові відходи:

- з харчової промисловості та виробництва напоїв;
- з переробки фруктів та овочів;
- з пивоварних заводів (наприклад, відпрацьоване зерно, дріжджі);
- молочні (наприклад, сироватка, відходи виробництва сиру);
- з переробки м'яса, включаючи побічні продукти тваринного походження (наприклад, кров, жир, субпродукти);
- з целюлозно – паперової промисловості (наприклад, осади стічних вод, залишки від переробки деревини).

3. Комунальні відходи:

- органічна фракція комунальних відходів (харчові/кухонні відходи, відходи з садів);
- осади стічних вод з очисних споруд комунальних стічних вод.

4. Стічні води:

- з молокопереробної промисловості;
- з пивоварних та лікєро – горілчаних заводів;
- з бійні.

В умовах великого попиту на електро – та теплову енергію, для суміжних сільськогосподарських підприємств постає ще одна проблема – одержання сировини для постійної експлуатації біоустановок. Особливо гострою є така проблема для сезонних виробництв, наприклад, для цукрозаводів, заводів по виробництву безалкогольних напоїв, коли надходження сировини для виробництва біогазу має значні сезонні коливання впродовж року.

Частково проблему дефіциту сировини для виробництва біогазу можливо вирішити, якщо залучити відходи побічних виробництв, або ж збільшити продуктивність метанізації при однаковій кількості залучених відходів. Також фітодобавки, з значним вмістом олійних речовин, підвищують ступінь метанізації інших відходів у суміші.

Придатність субстрату для метанової ферментації залежить від різних факторів. Основними з них є схильність до біорозкладу, тобто

легкість, з якою органічний матеріал може розкладатися мікроорганізмами. Вона залежить від:

- Вмісту легкорозкладних сполук: матеріали, багаті на вуглеводи, білки та жири, більш схильні до біологічного розкладу. Прикладом є харчові відходи.
- Наявність важкорозкладних сполук: матеріали, що містять лігнін, целюлозу або хітин, важче розкладаються мікроорганізмами, наприклад деревина та тирса.

Другим фактором є розмір і пористість частинок: субстрат меншого розміру легше розкладається мікроорганізмами через більший співвідношення поверхні до об'єму. Тобто, менші частинки мають більшу поверхню, доступну для мікроорганізмів, що полегшує біорозклад, а матеріали з більшою пористістю можуть бути легше проникні для мікроорганізмів.

Таким чином, фітосировина, що вводиться до субстрату для метанової ферментації має містити переважно легкорозкладні біоорганічні сполуки, бути подрібненою і мати високу пористість.

Амарант є перспективною сільськогосподарською культурою [4,5]. Його особливістю є великий приріст біомаси, що дозволяє отримувати до 500 – 600 ц дешевої зеленої рослинної сировини з гектару навіть в умовах збіднених ґрунтів і до 2000 ц з гектара на Поділлі. Олія амаранту набуває значного харчового та технічного значення. Практичне значення амаранту реалізується і у сфері альтернативних енерготехнологій. Цікаве і перспективне є застосування вказаної рослини для підвищення ефективності вироблення біогазу шляхом стимуляції метаногенної мікрофлори [6]. Екологічна привабливість цієї культури також полягає у можливості її вирощування в санітарних зонах заводів по виробництву біогазу та біля полів біологічного очищення стічних вод, лагун із зберіганням дигестату. В цьому випадку ми забезпечуємо замкнене функціонування екологічної біотехнології.

У контексті зазначеного вище було визначено **мету нашого дослідження**, яка полягає у можливості застосування амаранту у виробництві біогазу та використання цих даних для розробки екологічно обґрунтованих методів господарювання.

Матеріали і методи

Для досягнення максимальної інтенсивності зброджування біовідходів у реакторі з отриманням біогазу необхідно створити найбільш сприятливі умови для груп мікроорганізмів, що відповідають кожному з етапів зброджування, у тому числі на стадії їх підготовки до завантаження у реактор [5]. Рослинні субстрати у вихідному вигляді досить складно піддаються метановому бродінню в силу своєї фізико – хімічної структури.

Так, основними компонентами рослинного сировини, що беруть участь у чотирістадійній метановому бродінні (гідроліз, ацидогенез, ацетогенез, метаногенез) у присутності анаеробних мікроорганізмів, виступають

вуглеводи (легко – і важкогідролізовані полісахариди – геміцелюлози та целюлоза), білки (рослинні протеїни) та жири (олії).) Для досягнення максимальної інтенсивності зброджування біовідходів у реакторі з отриманням біогазу необхідно створити найбільш сприятливі умови для груп мікроорганізмів, що відповідають кожному з етапів зброджування, у тому числі на стадії їх підготовки до завантаження у реактор [6].

Вміст целюлози в рослинній сировині зазвичай вище, ніж легкогідролізованих полісахаридів, що може обумовлювати найбільші витрати за часом у процесах синтезу біогазу [7]. Лігнін, присутній у рослинах, істотно ускладнює ферментоліз. Для вирішення цієї проблеми у ферментні комплекси можуть бути введені відходи тваринного походження, або додаткові ферменти для деструкції лігніну. Рослинні сільськогосподарські відходи доцільно структурно і хімічно змінювати з метою підвищення інтенсивності мікробіологічної обробки, наприклад, додатково вводити рослини з високим вмістом олій. Відомі технології метанізації при додаванні рапсу до основних рослинних відходів набули практичного застосування; також досить поширено вирощування рапсу в межах санітарно – захисних зон підприємства [8]. В нашому випадку, рапс підприємство, що входить до єдиного комплексу цукрозаводу, використовує для виробництва біодизелю на наявних потужностях. Крім того, дозрівання амаранту відбувається в час максимальної експлуатації потужностей цукрового заводу і можна уникнути додаткових витрат на зберігання рослинних відходів. Тому пропонуємо практичне значення амаранту реалізувати у сфері альтернативного виробництва біогазу, біднішого на вміст жирів.

Як сировину використовували промислові відходи цукрового виробництва – жом, бурякове бадилля, мелясу; а також вегетативну масу рослин амаранту і висушену рослинну масу амаранту (температура 60⁰С, 4 – 5 годин в промислових дегідраторях). Амарант подрібнювали, змішували з основою у співвідношенні 1:1 і витримували дослідну масу 4 доби. Отримані зразки амаранту спочатку аналізували, потім суміші піддавали мікробіологічній обробці ферментним комплексом метаногенних бактерій в лабораторії.

Вміст целюлози у вихідній сировині та суміші визначали хлористим методом, лігніну – сірчанокислотним методом; азоту і карбону – за допомогою автоматичного аналізатору Primacs SNC – 100, а потім розраховували їх масове співвідношення [4]. Вологість сировини визначали стандартним ваговим методом.

Мікробіологічну обробку активованих зразків здійснювали в лабораторії за наступних умов. Ферментний препарат – SUKAZYM ZH – 1002 у вигляді порошку чи розводи з дистильованою водою до концентрації 8,3 г/л. В отриманий розчин поміщали дослідні зразки до концентрації 166 г/л, відповідно загальна витрата ферментного препарату – 0,05 г/г субстрату. Значення рН витримували на рівні 6,5...7,5 за температури – 32...35 °С, без перемішування та доступу кисню. Кількість

газу, що утворюється, визначали об'ємним методом кожен добу. Проби газу перевіряли газоаналізатором без припинення метаногенезу, при максимальному та аналізували на вміст CO₂, CH₄, N₂, H₂. Експеримент вважали закінченим, коли щоденний вихід газу становив менше 1% від загального виходу протягом 3 днів (до 40 діб).

Результати досліджень

Результати компонентного аналізу вегетативної та висушеної маси амаранту представлені у таблиці 1.

Таблиця 1. Хімічний склад рослини амаранту

| Показник | Зелена маса амаранту | Висушена маса амаранту |
|--|----------------------|------------------------|
| Целюлоза,% | 38,9 | 36,2 |
| Цукор,% | 4,5 | 5,8 |
| Лігнін | 13,2 | 11,8 |
| Співвідношення карбон: нітроген, мас.ч. | 1:1,5 | 1:1,4 |
| Вологість сировини, % | 34 | 11,3 |

Як свідчать результати таблиці 1, целюлоза при сушінні амаранту залишається термостабільною, на що вказує її незначне кількісне зниження на 7,5% в перерахунку на абсолютно суху речовину. Невелике зниження концентрації целюлози в рослинній сировині у міру збільшення температури обробки може свідчити про гідролітичну деструкцію її аморфної частини до дисахароз, на що вказує збільшення вмісту цукру. Факт деструкції аморфної частини целюлози дозволяє прогнозувати інтенсифікацію ферментативного гідролізу целюлозними комплексами, що беруть участь у першій стадії метаногенезу. У сухому амаранті спостерігали незначне збільшення вмісту лігніну. Оскільки лігнін відноситься до полімерів складного невпорядкованого будови, його легкодеструктуровані форми піддаються гідролізу до низькомолекулярних фрагментів, які можуть вступати в реакцію поліконденсації між собою, також з продуктами гідролізу проліцукридів, що сприяє утворенню нових форм лігніну та лігноцукрів [9]. Для метанового зброжування більш прийнятно використовувати сировину нижчої вологості, а співвідношення карбону і нітрогену було оптимальним для двох варіантів.

Отримані субстрати за трьома варіантами:

1. контрольний: суміш відходів цукрового виробництва
2. суміш відходів цукрового виробництва+ зелена маса амаранту
3. суміш відходів цукрового виробництва+ суха маса амаранту

спрямовувались на початкову стадію метанового бродіння. Для всіх зразків субстратів, у тому числі контрольного, активний вихід біогазу починався на 2...5 добу. Визначали добовий вихід біогазу, результати досліджень представлені на рисунку 1.

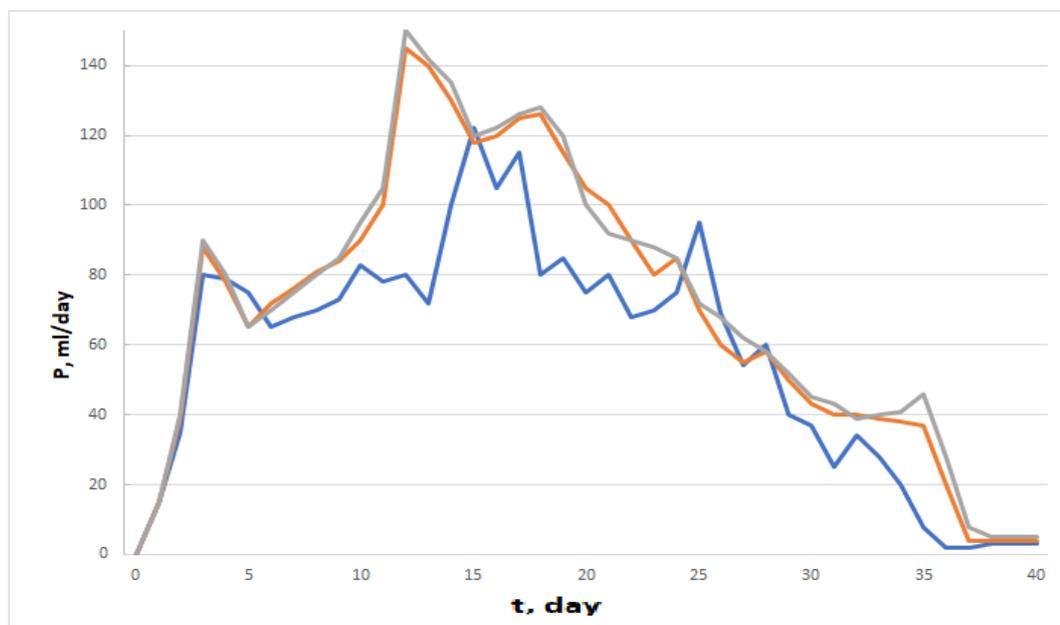


Рис. 1. Добовий вихід біогазу в лабораторних умовах
—варіант 1; —варіант 2; —варіант 3.

Результати вказують, що використання в суміші амаранту призвело до зміщення часу максимального виходу біогазу до 13 (до 150 мл/добу), причому у зразка без обробки він відзначений на 15 добу (121 мл на добу). Оскільки максимальний вихід спостерігали в експоненціальній фазі, в якій мікроорганізми споживають найбільшу кількість поживних речовин, можна зробити висновок про підвищену доступність субстрату за кожним варіантом. Після настання піку відбувалося закономірне зниження добового виходу біогазу для дослідних зразків, однак для контрольного зразку також спостерігали декілька піків. Характер кривих дослідних зразків було дуже подібне, з незначним більшим виходом газу при наявності в суміші сухого амаранту. Час закінчення процесу метаногенезу для зразків 1,2,3 становив 37, 39 і 40 діб відповідно.

Спостерігали, що склад біогазу, а отже, і його калорійність змінюється з часом. Для контрольного варіанту, максимальний вихід метану спостерігали на 37 добу (наприкінці процесу метаногенезу), він склав 56 %, для варіантів 2 і 3 на 30 – 32 добу, він досягав 60%. Усереднений склад біогазу для трьох сумішей наведено в таблиці 2.

Таблиця 2. Склад біогазу, отриманих при зброджуванні субстратів

| Варіант | CH ₄ | CO ₂ | O ₂ | N ₂ | CO |
|---------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|-------|
| 1 | 50 | 13 | 3 | 33 | сліди |
| 2 | 55 | 11 | 2,5 | 29,5 | сліди |
| 3 | 55 | 12 | 3 | 29 | сліди |

Дослідження вказують, що застосування в сумішах амаранту збільшує калорійність біогазу, водночас спостерігали зниження вмісту

азоту. Можна припустити, що частково метанізація відбувається і за рахунок метаболізму метиламідів [10].

Було також досліджено можливість використання амаранту сорту Ацтек як сировини для виробництва біогазу разом з жомом цукрових буряків в реальних промислових умовах. Експеримент проводився з двома варіантами:

Варіант 1: контроль: буряковий жом (вологість 80%)

Варіант 2: дослід: буряковий жом з аналогічним вмістом води та амарант свіжого вмісту за наближеним масовим співвідношенням 1:1.

Визначено, що при використанні вегетативної маси рослин амаранту з жомом у процесах метаногенезу збільшується вихід біогазу та його калорійність. В результаті проведених нами досліджень встановлено, що при використанні як субстрату бурякового жому (контроль) та бурякового жому з додаванням сухого, або ж свіжого амаранту вихід газу відрізнявся в незначній мірі, в межах 8%, проте склад газу різко відрізняється. На 18 добу інкубації вміст метану в контролі становив 54,5%, а в досліді – 65,8%, (рисунок 2). Далі цей показник зменшується, що вказує на доцільність перенесення біомаси у доброджувач після 18 – 20 діб. У контрольного зразку максимальний вихід метану був більший впродовж всього процесу. З цього випливає, що жом цукрових буряків ферментується досить неефективно, але у поєднанні з амарантом є сприятливим харчовим ресурсом для метаногенної мікрофлори.

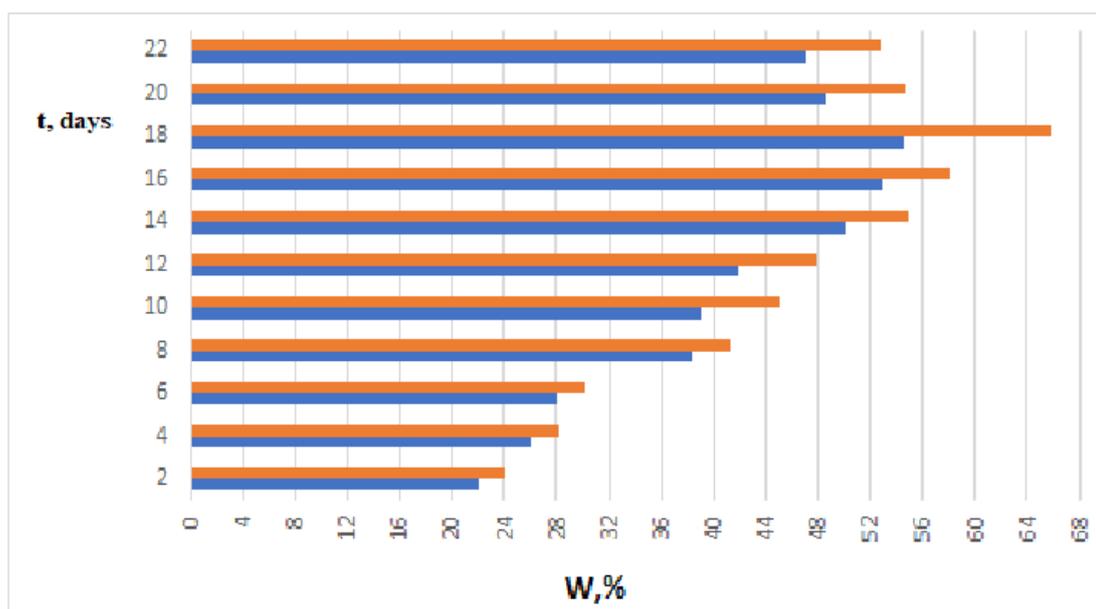


Рис. 2. Кінетика виділення метану з суміші жому цукрового буряка і амаранту
— контрольний варіант; — експеримент

Спеціалісти стверджують, що така комбінація досить схожа за характером метанізації до суміші відходів цукрового виробництва і пташиного посліду, однак в нашому випадку майже відсутні газоподібні сполуки побічного сульфуру, що спрощує технологію виробництва біогазу.

Висновки. Перспективним є застосування амаранту як сировини для підвищення ефективності вироблення біогазу шляхом стимуляції метаногенної мікрофлори та можливість вирощування культури в санітарних зонах заводів по виробництву біогазу, біля полів біологічного очищення стічних вод, лагун із зберіганням дигестату.

Додавання амаранту до суміші сільськогосподарських рослинних відходів збільшує біодоступність сировини, що дозволяє згенерувати на активованому субстраті 20 – 25% більше біогазу.

Отримані результати набувають особливої вагомості в контексті вирішення проблем екологічної та енергетичної безпеки, економічного зростання та сприяють зміні рівня розвитку екологічної свідомості фахівців аграрної сфери.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Abraham A.K., Mathew H., Park O., Choi R., Sindhu B., Parameswaran B., Sang I. Pretreatment strategies for enhanced biogas production from lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.*, 2020. 301, 122725, DOI:10.1016/j.biortech.2019.122725
2. L.Weng, Tang; Z. Huimin Industrial biotechnology: Tools and applications. *Biotechnol. J.*, 2009. 4, 1725–1739. DOI:10.1002/biot.200900127
3. M. Malovanyy, V. Nikiforov, O. Kharlamova, O. Synelnikov. Production of renewable energy resources via complex treatment of cyanobacteria biomass. *Chemistry & Chemical Technology*, 2016. 10(2), 251–254. DOI:10.23939/chcht10.02.251
4. H. K. Bons, M. Kaur . Role of plant growth regulators in improving fruit set, quality and yield of fruit crops: a review. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2020. 95(2), 137 – 146. DOI:10.1080/14620316.2019.1660591
5. R.Assad, Z. A.Reshi, S. Jan, I. Rashid. Biology of amaranths. *The botanical review*, 2017. 83, 382 – 436. DOI:10.1007/s12229 – 017 – 9194 – 1
6. S. Baetge, M. Kaltschmitt. Rice straw and rice husks as energy sources—comparison of direct combustion and biogas production . *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2018. 8. (3) 719 – 737. DOI:10.1007/s13399 – 018 – 0321 – y
7. Tymchuk, M. Malovanyy, O. Shkvirko, N. Chornomaz, O. Popovych, R. Grechanik, D. Symak, Review of the global experience in reclamation of disturbed lands. *Inzynieria Ekologiczna*, 2021. 22(1) 24–30. DOI:10.12912/27197050/132097
8. Tymchuk, M. Malovanyy, O. Bota, O. Shkvirko, O. Popovych . Biological reclamation using a sewage sludge – based substrate—A way to ensure sustainable development of urban areas. *Ecological Engineering & Environmental Technology*, 2022. 23. 34 – 41. DOI 10.12912/27197050/143029
9. Voytovych, M. Malovanyy, V. Zhuk, O. Mukha . Facilities and problems of processing organic wastes by family – type biogas plants in Ukraine. *Journal of water and land development*, 2020. 45. 185 – 189. DOI10.24425/jwld.2020.133493
10. M. Malovanyy, I. Tymchuk, V. Zhuk, V. Kochubei, I. Balandiukh, R. Grechanik, M. Kopyi. Mesophilic anaerobic digestion of broadleaf cattail suspensions using the fermented residues of yeast production as inoculum. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 2023 8. 100360. DOI 10.1016/j.cscee.2023.100360

1.11 ОДЕРЖАННЯ ЕКСТРАКТІВ КАЛУСНОЇ БІОМАСИ АМАРАНТУ ДЛЯ КОСМЕТИЧНИХ ЗАСОБІВ

Гуцько К. І., Петріна Р. О.

Національний університет «Львівська політехніка», Україна

kateryna.i.hutsko@lpnu.ua

У насінні та траві амаранту виявлені вторинні метаболіти різних класів, що проявляють антимікробну, антиоксидантну, ранозагоювальну дію. Для отримання чистої сировини незалежно від природніх умов актуальним є використання методу культури тканин. Було отримано екстракти калусу амаранту та досліджено кількість поліфенольних сполук та флавоноїдів. Для виготовлення косметичних засобів перспективним є використання амодиметиконових та 100% гліцеринових екстрактів *A.hybridus* як активних компонентів.

Ключові слова: калусна біомаса амаранту, екстракти, поліфенольні сполуки, флавоноїди, косметичні засоби.

Псевдозлаки, такі як кіноа, амарант, гречка, чіа, використовують не лише у харчуванні, але й для виготовлення харчових добавок та фармацевтичних препаратів. Амарант був основним продуктом харчування в цивілізаціях ацтеків, майя та інків, зараз він залишається однією із важливих культур у багатьох країнах Америки, Південно – Східної Азії та Африки. У Європі його потенціал вирощування та використання залишаються недооціненими [1,2]. Амарант використовують як харчову, кормову, декоративну та лікувальну рослину. В Україні над селекцією амаранту почали працювати у 1980 – х роках, і вирощували як корм для потреб сільського господарства. До 2022 року основні площі посівів були сконцентровані у Чернігівській, Дніпропетровській та Полтавській областях [3]. В Україні зареєстровано близько 19 сортів амаранту. Найпоширеніші сорти: Харківський – 1 (*Amaranthus hypochondriacus* L), Лера (*A. hypochondriacus* L), Ультра (*Amaranthus hybridus* L), Сем (*A. hypochondriacus* L), Геліос (*Amaranthus caudatus* L), Студентський (*A. hypochondriacus* L) [4].

Амарант містить близько 4,2% клітковини, 12,5 – 17,6% білка, всі незамінні амінокислоти. Кількість ліпідів в амаранті варіюється залежно від сорту і становить 1,9 – 9,7%, у насінні виявлено високу кількість пальмітинової, олеїнової, лінолевої та ліноленової кислот, токофероли, 6 – 8% сквалану[1]. У листі та коренях *Amaranthus spinosus*, листі та насінні *Amaranthus viridis* та *A. hybridus*, листі *Amaranthus graecizans* виявлено алкалоїди, флавоноїди, фенольні кислоти, стероїди, сапоніни, дубильні речовини, каротиноїди, тритерпени, глікозиди[5].

Амарант проявляє антибактеріальну, протизапальну, ранозагоювальну, антигіпертензивну, протиракову, гіпохолестеринемічну,

антиатеросклеротичну дію. У народній медицині використовують для лікування діареї, рясних менструацій та кишкових кровотеч, хворіб сечовидільної системи, лейкореї. Екстракти з квітів амаранту застосовують зовнішньо для полегшення болю та лікування шкірних захворювань[1].

Антиоксидантну дію проявляють екстракти із високим вмістом поліфенольних сполук (*A. gangeticus*), бетаксантинів та беталаїнів (*A. tricolor*), та гідролізати білків із високим вмістом лейцину аланіну та фенілаланіну[1]. Екстракти *A. tricolor* проявляють антимікробну (проти *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* та *Pseudomonas aeruginosa*) та протигрибкову активність (проти *Candida albicans*, *Penicillium chrysogenum*, *Candida glabrata* та *Penicillium aurantiogriseum*) [1].

Мазі із додаванням 2%, 5% та 10% етанольного екстракту *A. viridis* прискорювали процес загоєння рани та періоду епітелізації у щурів з діабетом. Швидше ранозагоєння спричинене стимуляцією інтерлейкіну, швидшим дозріванням грануляційної тканини. Під час процесу загоєння рани помічено збільшення кількості колагену через посилену міграцію фібробластів та епітеліальних клітин[8].

Існує ряд агрокліматичних обмежень, що ускладнюють отримання стабільної за якістю біомаси амаранту для створення харчових добавок, фармацевтичних та косметичних засобів. Амарант є теплолюбною та вологолюбною рослиною, оптимальною для активного росту є температура повітря 35°C[2]. Кількість опадів та перепад температур на території лісостепової зони України є нестабільними. Багато сортів амаранту є посухостійкими, але негативно на них впливають заморозки під час вегетаційного періоду [6]. При вирощуванні в природніх умовах амарант накопичує високу кількість оксалатів та нітратів, важкі метали[1,7]. Значна частина площ, раніше задіяних для вирощування амаранту в Україні, наразі є недоступною для використання через військові дії.

Перспективним є застосування біотехнологічного методу культивування рослинних тканин, адже тоді забезпечується безперервне і надійне джерело біомаси протягом року. Культура тканин дозволяє отримати біологічно та хімічно чисті рослини *in vitro* (мікроклональне розмноження), або масу недиференційованих тотипотентних клітин із високим вмістом вторинних метаболітів (калусна біомаса)[9].

Для отримання калусної біомаси використовують фрагменти рослин (експланти), які поверхнево стерилізують та вводять в агаризоване поживне середовище, яке складається із неорганічних солей, глюкози, мезоінозиту, гліцину, агару, вітамінів та регуляторів росту в оптимальних концентраціях (рис.1). Всі дії проводять у асептичних умовах у ламінарному боксі[9]. Для отримання максимальної кількості біомаси необхідно підбирати склад модифікованого середовища, метод підготовки та стерилізації експлантату, умови культивування для кожного виду рослини [10].



Рис 1. Методика отримання калусної біомаси рослин *in vitro*

Опубліковано декілька досліджень про отримання калусної біомаси амаранту. Наприклад, насіння *A. tricolor* та *A. spinosus* стерилізують фунгіцидним засобом та 10% розчином гіпохлориту кальцію, промивають стерильною дистильованою водою та вносять на базальне середовище Мурасиге – Скуга (МС). Як експланти для отримання калусу використовують гіпокотильні сегменти паростків амаранту, які вносили на середовища із регуляторами росту бензиламінопурином (БАП) та нафтилоцтовою кислотою (НОК). Найбільша кількість біомаси *A. spinosus* була отримана при додаванні у середовища 0,5 мг/л БАП та 5,0 мг/л НОК. Оптимальними концентраціями регуляторів росту для отримання калусу *A. tricolor* були 0,5 мг/л БАП та 10,0 мг/л НОК [11]. Високий вміст цитокінінів сприяє проліферації калусу *A. tricolor* та пригнічує біосинтез флавоноїдів, тому важливим є додавання у середовище ауксину. Внаслідок підбору оптимальних концентрацій регуляторів росту можна досягти вищого вмісту поліфенольних сполук та флавоноїдів у калусній культурі порівняно із диференційованими тканинами амаранту [12]. Для отримання калусної біомаси *A. cruentus* із високим вмістом пігментів (бетаксантини, беталаїни) експланти листя, стебла та кореня вносять на середовище із 1,5 мг/л індолілоцтової кислоти (ІОК) та 1,5 мг/л Зеатину (Зеа) [13].

Описано методику отримання калусної біомаси українських сортів амаранту «Геліос» та «Глевахівський». Насіння *A. caudatus* (сорт Геліос) стерилізували в 1% розчині комерційного препарату «Білизна» та 3% розчині перексиду водню, вносили на базальне середовище МС для отримання асептичних паростків. Високу кількість калусної біомаси отримували при внесенні експлантів гіпокотилля та листкових пластинок на середовище із 1 мг/л 2,4 – Д і 1 мг/л кінетину [14]. Описано ефективне ініціювання утворення первинного калусу *A. caudatus* та *A. hypochondriacus* (сорт Глевахівський) при використанні середовища із 0,5 мг/л 2,4 – Д, 1 мг/л НОК і 0,5 мг/л кінетину [15].

Екстракти рослин використовують у косметичі та космецевтиці як активні компоненти із комплексною дією. Велику увагу приділяють екстрактам з високим вмістом поліфенольних сполук та флавоноїдів. У

європейській базі даних косметичних інгредієнтів COSMILE Europe представлено 136 активних компонентів отриманих методом культури тканин. Це екстракти калусної біомаси *Bambusa vulgaris*, *Acalypha reptans*, *Aloe barbadensis*, *Allium grayi*, *Camellia sinensis*, *Curcuma longa*, *Echinacea purpurea*, *Ginkgo biloba* та інших рослин[16].

У косметиці часто використовують нерафіновані олії *A. cruentus*, *A. caudatus*, *A. hypochondriacus*, *A. spinosus*, які зволожують шкіру, знімають подразнення, прискорюють загоєння ран, мають антибактеріальні та антиоксидантні властивості [1].

У складі косметичних засобів корейських та деяких європейських виробників є екстракт насіння *A. caudatus*. Даний косметичний компоненту виготовляє компанія Symrise AG (Німеччина) під торговою назвою Extrapone® Amaranth GW. Для його виготовлення насіння *A. caudatus* подрібнюють, екстрагують водою, водний екстракт упарюють та сушать розпиленням з мальтодекстрином. Концентрований екстракт розводять у суміші води та гліцерину, загущують ксантановою камеддю, додають консерванти[17]. Актив «Amaranthus Seed Extract» виготовляє компанія MakingCosmetics Inc. (США), він складається із води (88 – 92%), екстракту насіння *A. caudatus* (8 – 12%) та консерванту бензоату натрію (0,9 – 1,1%). Технологія виготовлення полягає у екстракції рослинної сировини для отримання концентрату із подальшим розчиненням у воді до необхідної концентрації.

Корейська компанія Enough у складі косметичних засобів має екстракт насіння *A. hypochondriacus*, українські виробники StoyanA та Vesna мають у асортименті декілька засобів із екстрактом насіння *A. cruentus*. Гліколієвий екстракт амаранту використовують для виготовлення тоніку для обличчя компанія Amore (Україна).

Як активний компонент також використовують CO₂ Amaranth extract. Одним із виробників є українська компанія «Флосвіта» (Харків). Вказано, що у екстракті виявлено амарантин, рутин, каротиноїди, сквален, терпеноїди (α – пінен, евкаліптол, камфора, борнеол, вербенон), жирні кислоти (лаурилова, мірістинова, пальмітинова, гексадеканова, лінолева, олеїнова, стеаринова, ріцинолева, ейкозанова), токофероли, фітостерини (гентриаконтан, хондриластерол, сітостерол)[18]. Німецький виробник FLAVEX Naturextrakte виготовляє CO₂ екстракт насіння *A. caudatus*, у якому виявлено високий вміст поліненасичених жирних кислот (20 – 35% олеїнової кислоти, 40 – 55% лінолевої кислоти), сквалену більше 5%, стероли та токофероли [19].

Асортимент косметичних інгредієнтів з амаранту, які доступні для українських виробників косметики, є обмеженим. Відповідно актуальним є отримання екстрактів калусної біомаси амаранту із високим вмістом вторинних метаболітів, як активного компоненту для космецевтичних засобів із протимікробною, антиоксидантною та ранозагоювальною дією.

Метою дослідження було одержання екстрактів калусної біомаси амаранту та кількісне визначення поліфенольних сполук і флавоноїдів для їх подальшого застосування в косметичних засобах. **Об'єктом**

дослідження було обрано калусну біомасу *A. hybridus* (сорт Ультра), адже його біохімічні показники відповідають вимогам фармацевтичної та косметичної промисловості[20]. **Предмет** дослідження: процес отримання екстрактів калусної біомаси амаранту та їхній поліфенольний і флавоноїдний склад.

Методи та матеріали.

Отримання калусної біомаси

Насіння замочували на 48 годин у дистильованій воді, стерилізували 20 хв у 30% пероксиді водню, тричі промивали у стерильній дистильованій воді та вносили на модифіковане середовище МС із регуляторами росту 3 мг/л БАП та 0,5 мг/л НОК. Всі дії проводили при асептичних умовах у ламінарному боксі. Культивування проводили протягом трьох місяців при освітлені 2000 лк, фотоперіоді 16/8 год (світло/темрява), температурі $20\pm 1^\circ\text{C}$, вологості 80%.

Проведення екстракції

Калусну біомасу збирали свіжою, проводили екстракцію мацерацією, використовуючи як екстрагенти речовини, що широко використовуються у косметичній галузі: гліцерин (50 та 100%), пентиленгліколь, емомент Caprylic/Capric Triglyceride, силікон амодиметикон. Тривалість екстракції становила 10 діб, співвідношення сировина до екстрагенту 1:10, температура $20\pm 1^\circ\text{C}$. Після закінчення екстракції проводили фільтрування через тканинний фільтр. Отриманий екстракт на основі Caprylic/Capric Triglyceride змішували із полісорбатом – 80 для забезпечення його розчинення у водних та спиртових системах.

Визначення вторинних метаболітів

Кількісне визначення поліфенолів виконували спектрофотометричним методом на спектрофотометрі UNILab 108UV із використанням реагенту Фоліна – Чекольтеу. Результат виражено у вигляді еквівалента галової кислоти (ГК). До 20 мкл досліджуваного екстракту додавали 1,58 мл дистильованої води, 100 мкл реагенту Фоліна – Чокальтеу й витримували в темноті 5 хвилин. Потім додавали 300 мкл 7 % водного розчину Na_2CO_3 . Витримували протягом 2 год у темряві за кімнатної температури. Оптичну густину вимірювали за довжини хвилі 760 нм. Паралельно виконували аналогічні дії, використовуючи розчини галової кислоти відомої концентрації замість екстрактів, з метою побудови стандартної кривої, за якою визначають кількість поліфенолів у досліджуваних екстрактах. Здійснено п'ять повторень вимірювання кожного зразка [21].

Кількісне визначення флавоноїдів здійснювали спектрофотометричним методом на спектрофотометрі UNILab 108UV, з використанням алюмінію хлориду. Результат виражено у вигляді еквівалента рутину. Для визначення загального вмісту флавоноїдів до 0,2 мл екстракту додавали 0,2 мл 3 % розчину алюмінію хлориду, 0,01 мл розведеної оцтової кислоти, 1,09 мл 96 % етанолу. Витримували протягом 40 хвилин у темряві. Оптичну густину вимірювали за довжини хвилі 420

нм. Паралельно було визначено оптичну густину розчину рутину відомої концентрації, приготованого аналогічно досліджуваному розчину. Вміст флавоноїдів в аналізованих екстрактах обчислювали у перерахунку на рутин за формулою:

$$X = \frac{A_1 * m_0 * 0,2 * 2,5}{A_0 * 50 * 2,5 * 2} \text{ мг/мл, (1)}$$

де A_1 – оптична густина досліджуваного екстракту; A_0 – оптична густина розчину рутину; m_0 – маса рутину, г [21].

Результати

У результаті досліджень отримано екстракти калусної біомаси амаранту сорту «Ультра» із різною кількістю поліфенольних сполук та флавоноїдів. Результати подано у таблиці 1.

Таблиця 1. Кількісний вміст поліфенольних сполук та флавоноїдів у екстрактах калусу *A. hybridus*

| Екстрагент | Вміст вторинних метаболітів, мг/мл | |
|------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|
| | Поліфенольні сполуки | Флавоноїди, *10 ⁻⁵ |
| 50% гліцерин | 0,0175 | 0,0085 |
| 100% гліцерин | 0,1322 | 0,0308 |
| Амодиметикон | 0,2254 | 0,5819 |
| Пентиленгліколь | 0,0386 | 0,0035 |
| Caprylic/Capric Triglyceride | 0,0093 | 0,0016 |

Було виявлено, що найбільша кількість поліфенольних сполук та флавоноїдів екстрагується силіконом амодиметиконом. Амодиметикон – це 35% катіонна емульсія амінофункціонального силіконового полімеру, у складі якого є окрім силікону тридецет – 12 та цетримонію хлорид. Відомо про ефективність екстрагування вітаміну С, флавоноїдів, дубильних речовин, глікозидів амодиметиконом із квітів календули[22]. Амодиметикон є речовиною хімічного походження, тому використання силіконових екстрактів є обмеженим у натуральній косметичі. З іншого боку, силікони використовують у засобах проти рубцювання. Прогнозовано, екстракт калусу амаранту на основі амодиметикону може проявляти не лише ранозагоювальну дію, а й інгібувати процес утворення рубця на місці поранення.

Незважаючи на те, що гліцерин є високополярною речовиною, при екстрагуванні 100% гліцерином вміст поліфенольних сполук був трохи нижчим порівняно із силіконовим екстрактом. Вміст вторинних метаболітів при екстрагуванні 50% гліцерином був дуже низьким. Гліцерин є дозволеним компонентом у натуральній косметичі, що робить екстракти більш привабливими для споживача. Популярними серед виробників косметики є гліцеринові екстракти Cosme – Phytamis від виробника Alban Muller (Франція). Для оптимізування екстрагування вторинних метаболітів можна змінити умови екстракції: використовувати ультразвук, перемішування, або змінювати температуру. Флавоноїди та

фенольні кислоти краще екстрагують при 40–60°C, але температури вище 80°C можуть призвести до їх деградації.

Пентиленгліколь є натуральним компонентом, який виготовляють із кукурудзи. Він має зволожувальні властивості, є водорозчинним і солюбілізатором для ліпофільних компонентів косметики. Його великою перевагою є посилення антимікробних властивостей інших компонентів, використання його як екстрагенту дозволяє забезпечити антимікробну стабільність засобу. Проте пентиленгліколевий екстракт калусу амаранту має незначну кількість поліфенольних сполук та флавоноїдів, тобто його біологічна дія буде низькою.

Емомент Caprylic/Capric Triglyceride має високу полярність, він є фракцією кокосової олії, у зв'язку з цим він краще екстрагує жиророзчинні компоненти із сировини. Доцільно дослідити екстракти біомаси амаранту на основі емоменту на вміст токоферолів, каротиноїдів, сквалану. Низька кількість поліфенольних сполук та флавоноїдів у екстракті на основі Caprylic/Capric Triglyceride може бути зумовлена їх мінімальною фоновною розчинністю або аналітичною похибкою.

Висновки. Отже, отримано екстракти калусу амаранту із використанням різних екстрагентів. Найвищий вміст поліфенольних сполук та флавоноїдів виявлено в екстрактах, одержаних із застосуванням амодиметикону та 100% гліцерину. Силіконовий екстракт не підходить для виготовлення натуральних косметичних засобів, через синтетичну природу екстрагенту. Гліцеринові екстракти потребують додаткових модифікацій умов екстракції для збільшення кількості вторинних метаболітів у них. Екстракти калусної біомаси амаранту є перспективними для використання в косметичних засобах із протизапальною, антиоксидантною, протимікробною дією, які стимулюють регенерацію шкіри.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Sattar, M., Saeed, F., Afzaal, M., Rasheed, A., Asif, A., Sharif, S., & Al Jbawi, E. (2024). An overview of the nutritional and therapeutic properties of amaranth. *International Journal of Food Properties*, 27(1), 263–272. <https://doi.org/10.1080/10942912.2024.2304266>
2. Tyrus, M., Lykhochvor, V., Dudar, I., Stefaniuk, S., & Andrushko, O. (2023). Amaranth yield depending on the sowing rate. *Scientific Horizons*, 26(8), 33 – 41.
3. Грюнвальд, Н. (2022). Історична ретроспектива селекційної роботи з амарантом в Україні (80–90 – ті рр. ХХ ст.). *Науково – теоретичний альманах Грані*, 25(5), 35 – 40. <https://doi.org/10.15421/172258>
4. Tyrus, M., & Lykhochvor, V. (2023). The yield of amaranth depending on the variety and sowing rate in conditions of sufficient moisture. *Foothill and Mountain Agriculture and Stockbreeding*, 73(1), 88 – 105. [https://doi.org/10.32636/01308521.2023 – \(73\) – 1 – 6](https://doi.org/10.32636/01308521.2023 – (73) – 1 – 6)
5. Adegbola, P.I., Adetutu, A., & Olaniyi, T.D. (2020). Antioxidant activity of *Amaranthus* species from the *Amaranthaceae* family – A review. *South African Journal of Botany*, 133, 111 – 117.
6. Янюк, Т., & Грюнвальд, Н. (2022). Виробництво амаранту в Україні: стан і перспективи. *Продовольчі ресурси*, 10(18), 179–192. <https://doi.org/10.31073/foodresources2022 – 18 – 18>
7. Huang, R., Xing, C., Yang, Y., Yu, W., Zeng, L., Li, Y., Tan, Z., & Li, Z. (2024). Phytoremediation and environmental effects of three *Amaranthaceae* plants in contaminated

- soil under intercropping systems. *The Science of the total environment*, 914, 169900. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.169900>
8. Sahoo, H. B., Sahoo, S. K., Mishra, K., & Sagar, R. (2015). Evaluation of the wound – healing potential of *Amaranthus viridis* (Linn.) in experimentally induced diabetic rats. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 5, 50–55. DOI: 10.4103/2231 – 0738.153792
9. Vakhariya, R. R., & Shah, R. R. (2019). Over Review on Plant Tissue Culture. *IJTSRD*, 4(1), 469 – 473.
10. Smith, R. H. (2001). Plant cell culture. In *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0002581>
11. Comia – Yebron, R., Aspuria, E. T., & Bernardo, E. L. (2017). Callus induction in *Amaranthus tricolor* and *Amaranthus spinosus*. *Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences*, 23, 12–23.
12. Xuan Y, Liu S, Xie L, & Pan J. (2023). Establishment of *Amaranthus* spp. calluses and cell suspension culture, and the effect of plant growth regulators on total flavonoid content. *Tropical Plants* 2(15). doi: 10.48130/TP – 2023 – 0015
13. Yaacob, J. S., Hwei, L. C., Taha, R. M., Mat Nor, N. A., & Aziz, N. (2012). Pigment analysis and tissue culture of *Amaranthus cruentus* L.. *Acta Hortic.* 958, 171 – 178. DOI: 10.17660/ActaHortic.2012.958.20
14. Ярошко, О. М. (2017). Індукція калюсоутворення і мікроклонального розмноження у *Amaranthus caudatus* L. (сорт Helios). *Вісник Харківського національного аграрного університету ім. В.В. Докучаєва. Серія «Біологія»*, 2(41), 78 – 84.
15. Жук, В. П., Сахно, Л. О., Хархота, М. А., & Ісаєнков, С. В. (2017). Жирно – кислотний склад калюсних культур з різних типів експлантів рослин амаранту. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, (20), 184 – 189.
16. COSMILE Europe. (n.d.). Search results for CALLUS CULTURE EXTRACT [Database search results]. Retrieved October 27, 2025, from <https://cosmileeurope.eu/inci/results/?q+=CALLUS+CULTURE+EXTRACT>
17. The Good Scents Company Information System. *Amaranthus caudatus* seed extract [Data sheet]. Retrieved October 27, 2025, from <https://www.thegoodscentscompany.com/data/ex1075031.html>
18. CO₂ Extract. (n.d.). *Amaranthus* [Product page]. Retrieved October 27, 2025, from <https://www.co2extract.com.ua/uk/product/amaranthus/>
19. FLAVEX Naturextrakte GmbH. (2025). *Amaranth*samen CO₂ – to Extrakt (ökol), Produkt – Nr. 168.002 [Product page]. Retrieved October 27, 2025, from https://www.flavex.com/produkt/168_002/
20. Заремба, Є. Х., Заремба, В. С., Заремба – Федчишин, О. В., & Заремба, О. В. (2010). Патогенетичне обґрунтування застосування олії амаранту в клінічній практиці. *Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології*, (4), 19 – 32.
21. Hutsko, K. I., & Petrina, R. O. (2024). Амарант як джерело вторинних метаболітів з потенційною ранозагоювальною активністю. *Chemistry, Technology and Application of Substances*, 7(2), 92–99. <https://doi.org/10.23939/ctas2024.02.092>
22. Кравчук, І. В., Салеба, Л. В., & Семешко, О. Я. (2024). Розробка складу та дослідження властивостей емульсії косметичного призначення із застосуванням композицій силікону та силіконового екстракту календули лікарської. *Вісник Херсонського національного технічного університету*, 3(90), 187 – 200. DOI: <https://doi.org/10.35546/kntu2078 – 4481.2024.3.24>

1.12 КАЛУСНА БІОМАСА *ARNICA MONTANA* ЯК АЛЬТЕРНАТИВА ПРИРОДНІЙ ФІТОСИРОВИНІ

Домашовець А. О., Петріна Р. О.

Національний університет «Львівська політехніка», Україна

anhelina.domashovets.mnbtm.2024@lpnu.ua

У даному розділі монографії досліджено можливість отримання калусної біомаси *Arnica montana* як сталої альтернативи дефіцитній природній сировині. Здійснено порівняльний аналіз шести варіацій поживного середовища Мурасиге – Скуга для встановлення найбільш ефективних умов індукції і росту калусу з насіння *A. montana*. Визначено оптимальну комбінацію фітогормонів і вітамінів, що забезпечує максимальний вихід біомаси. Отримані результати є основою для розробки й оптимізації промислового культивування калусу *Arnica montana* як джерела цінних біологічно активних речовин.

Ключові слова: *Arnica montana*, фітосировина, калусна біомаса, рослинна культура *in vitro*, поживне середовище Мурасиге – Скуга.

Arnica montana є багаторічною трав'янистою рослиною родини *Asteraceae* із прямим залозистим стеблом і верхівковими темно – жовтими квітами – кошиками [1]. Впродовж століть сировина *A. montana* знаходила застосування у медицині як зовнішньо – при ударах, гематомах, вивихах, переломах, опіках, трофічних виразках й інших захворюваннях шкіри, так і внутрішньо – при стенокардії, кардіосклерозі, гіпертонічній хворобі, а також для покращення роботи серця та зміцнення нервової системи. Суцвіття (*Arnicae flos*) рослини, зібрані на початку цвітіння, використовуються в препаратах на основі етанольних екстрактів, таких як етанольна настоянка, що описана в Європейській фармакопеї як настоянка арніки (*Arnicae tinctura*) [2].

Arnica montana росте в гірських середовищах континентальної Європи, до 3000 м над рівнем моря [2]. Ще у п'ятдесятих роках ХХ століття записи рослини в Українських Карпатах були достатніми для щорічної заготівлі 5 – 10 т сухих суцвіть. Питання про необхідність охорони запасів арніки не було актуальним. Натомість зараз природні запаси *A. montana* в Україні виснажені [3]. Потреба збереження рослинного виду і його використання у фармацевтиці з мінімальним антропогенним впливом на гірські екосистеми спонукає вчених до розробки екологічних методів одержання біологічно активних речовин *Arnica montana*, наприклад – із використанням технології одержання калусної біомаси *in vitro*.

Метою роботи було проведення комплексного аналізу наукової літератури щодо методів індукції калусогенезу *A. montana*, а також – розробка ефективного складу поживного середовища для даного біопроекту. Відповідно, **об'єктом** є культура *A. montana in vitro*;

предметом дослідження є вплив складу поживного середовища та регуляторів росту на індукцію і розвиток калусу *A. montana*

Методи та матеріали

Рослинним матеріалом у дослідженні були експланти *A. montana*, отримані шляхом стерилізації поверхні насіння і подальшого пророщування в асептичних умовах. Для індукції калусу використовували шість модифікацій поживного середовища Мурасиге – Скуга, що проводили шляхом культивування експлантів на агаризованому середовищі в контрольованих умовах температури, вологості, освітлення. Динаміку росту калусу оцінювали візуально у визначені інтервали часу.

Результати

Arnica montana (рис. 1) – це лікарська рослина роду *Arnica*, що містить 32 види рослин. Висота рослини становить від 15 до 80 см; стебло одне: пряме, біля верхівки розгалужене, опушене. Прикореневі листки зелені, яйцеподібні, з дещо опушеною верхньою поверхнею, зібрані у розетки. Стеблові листки довжиною 3 – 5 см та шириною 2 – 3 см – сидячі, цілокраї, довгасті, супротивні та менші за прикореневі листки (що є винятком серед *Asteraceae*). Кореневище коротке, з коричневою поверхнею та білі всередині. На верхівці стебла розташовуються суцвіття – кошики, кількість яких може коливатися від 1 до 6. Квітки жовто – оранжеві, двостатеві, мають приємний специфічний запах. Плід – циліндрична, борозниста, звужена до основи, короткоопушена сім'янка [1, 3].



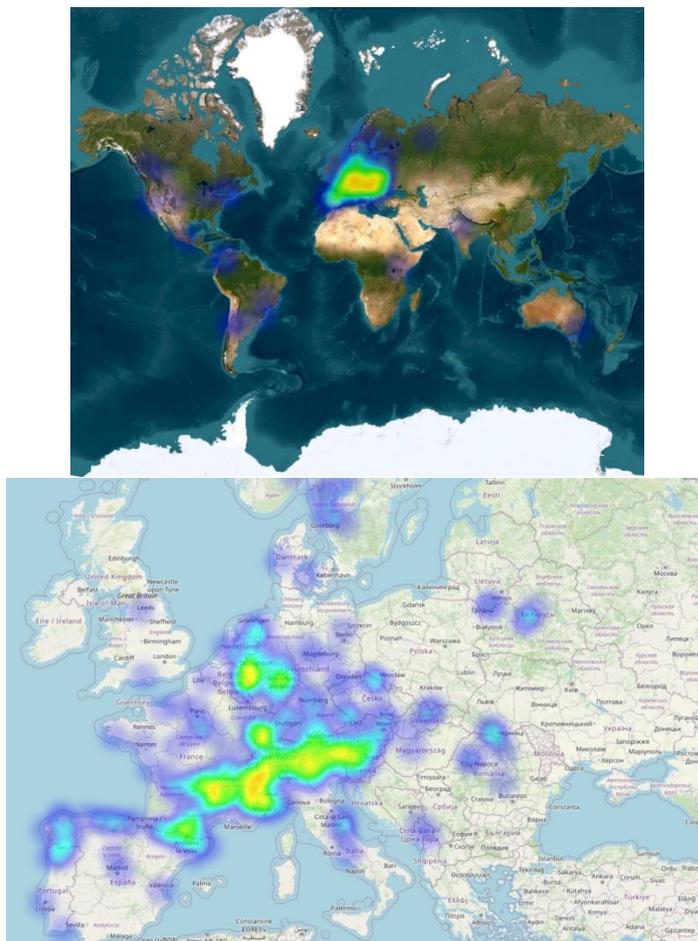
*Розробка авторів на основі [4], [5] та [Wikipedia](https://en.wikipedia.org/wiki/Arnica_montana).

Рис. 1. Морфологія *Arnica montana*

Arnica montana цвіте в червні – липні, а плоди досягають в кінці липня – на початку серпня. Ареал поширення рослини наведено на рис. 2.

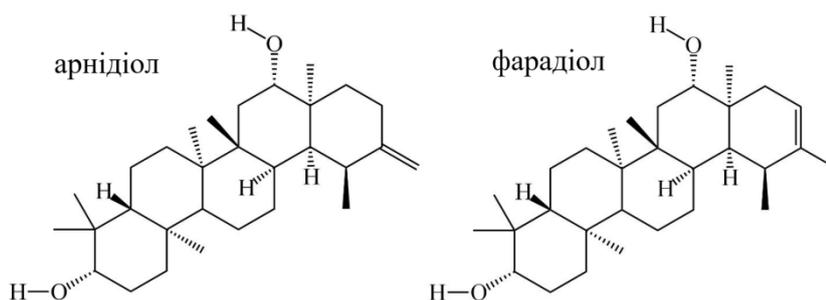
Основними біологічно активними речовинами *Arnica montana* є фенольні сполуки (кавова, хлорогенова, кумарова, ферулова, галова, ванільна, цинарінова кислоти), сесквітерпенові лактони (геленалін, 11,13 – дегідрогеленалін і їх естери тощо), ефірні олії, кумарини (умбеліферон, скополетин), каротиноїди і вітаміни. Фенольні сполуки володіють антиоксидантною дією, сесквітерпенові лактони зменшують набряки і запалення, а ефірні олії мають анестезуючі, антимікробні й антигрибкові

властивості. Серед БАР *Arnica montana* вирізняється **арніцин** (рис. 3), що є сумішшю двох ізомерних тритерпеноїдних речовин – арнідіолу і фарадіолу [1, 6].



*Візуалізацію створено за допомогою [PlantNet](#).

Рис. 2. Ареал поширення *Arnica montana* у світі та Європі



*З використанням редактора [KingDraw](#).

Рис. 3. Арніцин як суміш арнідіолу і фарадіол

Препарати *A. montana* мають кровоспинні, протисклеротичні, жовчогінні, подразнювальні, бактеріостатичні властивості. Застосовуються у поєднанні з іншими лікарськими рослинами при гепатиті, холециститі і холангіті. Зовнішньо настої квіток використовують у вигляді компресів для

лікування забитих місць, гематом, запальних захворювань шкіри, трофічних виразок, опіків, відморожень, болю у м'язах, при переломах та вивихах.

Попит на фітосировину *Arnica montana* у фармацевтичній і косметичній індустрії демонструє стійку висхідну динаміку: лише у 2024 році глобальний ринок продукції на її основі оцінювався приблизно у 300 млн. доларів США, а за прогнозами до 2033 року його обсяг перетне межу в 450 млн. дол. США. Найвищий рівень споживання спостерігається у Північній Америці та Європі, тоді як Азіатсько – Тихоокеанський регіон демонструє помірні, але висхідні темпи залучення до цього сегменту [7]. Забезпечення попиту традиційними методами заготівлі стикається з об'єктивними обмеженнями: природні популяції культури виснажуються внаслідок антропогенного тиску і низької регенераційної здатності виду, а культивування в умовах відкритого ґрунту супроводжується високою варіабельністю вмісту біологічно активних сполук. Зважаючи на те, що саме ці метаболіти визначають біологічну активність продукту, постає критична потреба у впровадженні відтворюваних технологій отримання стандартизованої сировини поза межами природних екосистем.

Одержання калусної біомаси *A. montana* розглядається як перспективний інструмент для створення стабільного джерела фармакологічно цінної біомаси. Культивування в умовах *in vitro* забезпечує повний контроль над морфогенезом і хімічним складом рослинного матеріалу, що дозволяє отримувати калусну біомасу з відтворюваною якістю. Окрім виробничої функції, ця технологія виконує й екологічну роль – слугує засобом збереження генофонду виду, природні популяції якого перебувають під загрозою виснаження.

У межах дослідження проведено порівняльну оцінку шести модифікацій середовища Мурасиге – Скуга, характеристика яких наведена у Таблиці 1.

Біомасу *Arnica montana* var. *montana* індукували з насіннєвого матеріалу та підтримували в умовах культивування протягом 28 діб. Результати спостережень засвідчили, що найбільш ефективними для пророщування насіння та ініціації калусогенезу у культури *A. montana* були середовища № 1 та № 2, тоді як решта середовищ демонстрували низьку ефективність або відсутність росту. Ключовим фактором, що визначав успішність ростових процесів, виявилася наявність ауксинових і цитокінінових фітогормонів, тоді як середовище без гормональної підтримки демонструвало нижчий рівень ростової активності. Таким чином, регуляція співвідношення ауксинів і цитокінінів є критичною умовою для ефективного запуску калусогенезу *Arnica montana* в культурі *in vitro*, що створює підґрунтя для подальшої оптимізації протоколів одержання калусної біомаси.

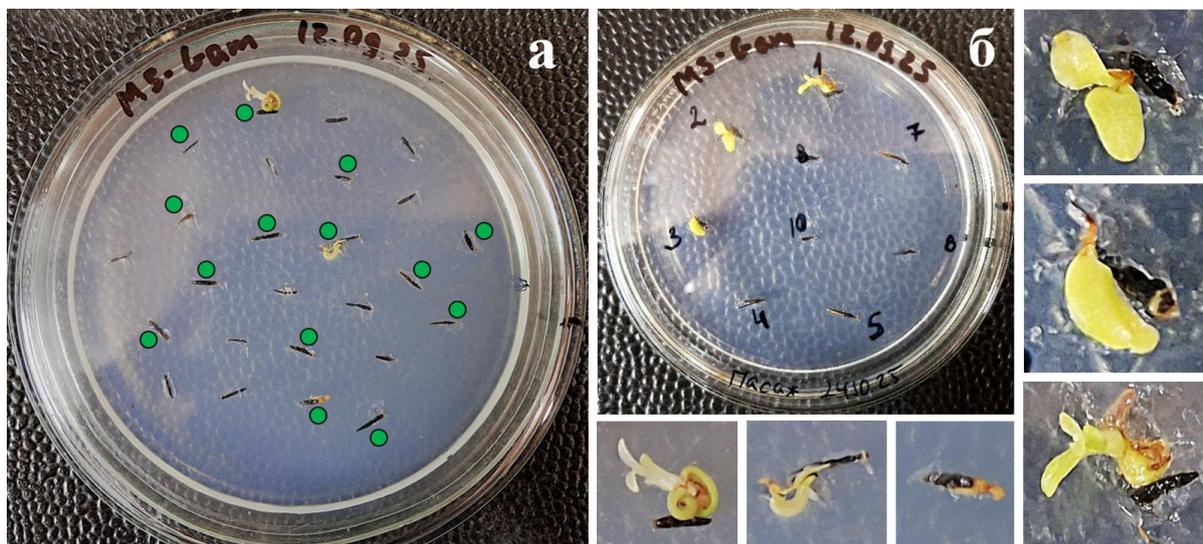
Отримані результати підтверджують ефективність досліджуваних варіацій поживного середовища Мурасиге – Скуга для одержання стандартизованої біомаси *A. montana*, здатної замінити або доповнити фітосировину.

Таблиця 1. Опис модифікацій поживного середовища Мурасиге – Скуга, використаних для дослідження

| № | Назва | Макро- та мікроелементи | Вітамінний блок | Гормональний блок | Ефективність проростання і калусогенезу |
|---|-----------------|--|---|---------------------------------------|---|
| 1 | MS – Gam – ph | класичний вміст солей середовища Мурасиге – Скуга | тіамін 10.0 ніацин 1.0 піридоксин 1.0 міо – інозитол 100.0 | 3 – ІОК 2.0 НОК 2.0 6 – БАП 1.0 | ++ |
| 2 | MS – Gam | | – | – | +– |
| 3 | MS – Vit – ph | | тіамін 0.1 ніацин 0.5 піридоксин 0.5 міо – інозитол 100.0 | 3 – ІОК 2.0 НОК 2.0 6 – БАП 1.0 | – |
| 4 | MS/2 – Gam – ph | половинний вміст солей середовища Мурасиге – Скуга | тіамін 10.0 ніацин 1.0 піридоксин 1.0 міо – інозитол 100.0 | – | – |
| 5 | M5524** | класичний вміст солей середовища Мурасиге – Скуга | – | – | – |
| 6 | M0404** | | тіамін 10.0 ніацин 1.0 піридоксин 1.0 міо – інозитол 100.0 | – | – |

*Розробка авторів. Одиниці вимірювання – [мг/л].

**Продукція MERCK KGaA, Sigma – Aldrich®.



*Розробка авторів

Рис. 4. *Arnica montana*. (а) Пророщування насіння на середовищі №1.
(б) Пасажування пророщеного насіння для подальшого калусогенезу

Масове отримання калусної біомаси *in vitro* забезпечує стабільність хімічного складу, а також відтворюваність біологічної активності фітосировини, що є критично важливим для фармацевтичного

застосування. В умовах зростання дефіциту природних ресурсів виду *Arnica montana* впровадження таких біотехнологічних підходів набуває стратегічного значення для створення промислового регламенту виробництва фітопрепаратів.

Висновки. У ході дослідження проведено порівняльну оцінку шести модифікацій середовища Мурасиге – Скуга з різним вмістом фітогормонів і вітамінів. Калусну біомасу *Arnica montana* індукували з насінневого матеріалу та культивували протягом 28 діб. Найінтенсивніший ріст калусної тканини спостерігалось на варіантах середовища з вітамінним блоком за Гамборгом і поєднанням ауксинів і цитокінінів. Оптимізація співвідношення фітогормонів визначає ефективність калусогенезу *A. montana in vitro* й створює основу для отримання стабільної біомаси, здатної частково замінити природну фітосировину у фармацевтичному виробництві.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖРЕЛ

1. Kriplani, P., Guarve, K., & Baghael, U. S. (2017). *Arnica montana* L. – a plant of healing: review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69(8), 925–945. <https://doi.org/10.1111/jphp.12724>.
2. Schmidt, T. J. (2023). *Arnica montana* L.: Doesn't Origin Matter? *Plants*, 12(20), 3532. <https://doi.org/10.3390/plants12203532>.
3. Грачов, А. (n.d.). Арніка гірська. URL: <https://plants.land.kiev.ua/15.php>.
4. Sugier, P., Rysiak, A., Sugier, D., Winiarczyk, K., Wołkowycki, D., & Kołos, A. (2022). Differentiation and propagation potential of *Arnica montana* L. Achenes as a consequence of the morphological diversity of flowers and the position of flower heads on the plant. *Plants*, 11(24), 3424. <https://doi.org/10.3390/plants11243424>.
5. Natural Resources Conservation Service. (n.d.). The PLANTS database: *Arnica montana* L. USDA. URL: <https://plants.usda.gov/plant-profile/ARMO8>.
6. Надь, Б. Б. (2014). Біоекологічні та біотехнологічні основи збереження генофонду *Arnica montana* L. в Закарпатті. Ужгород: ТІМПАНИ.
7. Verified Market Reports. (2025). *Global Arnica montana market size by application based, product form, end – user, distribution channel, functionality, geographic scope & forecast*. URL: <https://www.verifiedmarketreports.com/product/arnica-montana-market/>.

1.13 ВИКОРИСТАННЯ НОСІЇВ ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ БІОЛОГІЧНОГО ОЧИЩЕННЯ СТІЧНИХ ВОД

Жукова В. С., Саблій Л. А.

Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»
zhukova.veronika@lil.kpi.ua

Одним із шляхів підвищення ефективності біотехнології очищення стічних вод є підвищення концентрації мікроорганізмів активного мулу, біоплівки в об'ємі очисної споруди. З цією метою носії з іммобілізованими мікроорганізмами все частіше використовують в технологіях біологічного очищення стічних вод для підвищення якості очищеної води. Було встановлено, що концентрація біомаси, іммобілізованої на поверхні носіїв різних форм та розмірів, може досягати 5425 мг/дм³, що в 1,8 – 2,7 рази перевищує концентрацію в аеротенку.

Ключові слова: біотехнологія, мікроорганізми, активний мул, біоплівка, носії, іммобілізація

Біологічний метод очищення стічних вод є економічно вигідним для ефективного видалення органічних забруднюючих речовин порівняно з фізико – хімічними. Підвищення ефективності процесів для більш глибокого видалення, наприклад, сполук азоту, фосфору, (зокрема, за рахунок оптимізації інтенсивності аерації, вдосконалення конструкцій аераторів, реакторів, інтенсифікації мікробіологічних процесів) дозволяє знизити експлуатаційні витрати (особливо на електроенергію), зменшити об'єми утворених осадів (надлишкового активного мулу) і витрат на їх утилізацію та підвищити надійність роботи очисних споруд. Дослідження шляхів підвищення ефективності біотехнології очищення стічних вод є важливим для забезпечення сталого управління водними ресурсами, охорони навколишнього середовища та впровадження принципів циркулярної економіки в Україні.

Одним із ефективних шляхів інтенсифікації мікробіологічних процесів є використання іммобілізованих на носії мікроорганізмів [1, 2]. Завдяки оптимальному вибору носія для іммобілізації мікроорганізмів з урахуванням специфічних умов мікробної трансформації органічних речовин, що містяться у стічних водах, носій може активно впливати на середовище, стимулювати мікробний метаболізм, захищати клітини від несприятливих факторів та сприяти довготривалому збереженню їх біохімічної активності. Вибір носія біоплівки є критичним фактором, оскільки носій впливає на оптимальну товщину біоплівки, ріст біомаси та ефективність біологічного розкладу забруднюючих речовин різного походження. В системах IFAS і MBBR використовують дві групи носіїв: дисперсні, що розподіляються по всьому об'єму аеротенка, і фіксовані (нерухомі закріплені) носії. Дисперсні

носії мають переваги в ефективному перемішуванні та великій площі поверхні, вони самоочищаються, не потребують зворотного промивання, системи з такими носіями є економічно вигідними, простими в експлуатації. Фіксовані носії можуть забезпечити більш ефективну нітрифікацію в холодному кліматі, біомаса обростає на них є більш стійкою до зміни гідравлічного режиму в реакторі [3].

Природа мікробних клітин в активному мулі сприяє їх прикріпленню та агрегації на твердих поверхнях. Крім того, утримання (збереження на носіях) повільно зростаючих нітрифікуючих колоній у вигляді біоплівки в біореакторі підвищує ефективність очищення стічних вод (від вуглецю, сполук фосфору, аміаку та амонійних солей) [4, 5]. Широкий спектр штучних твердих матеріалів (наприклад, поліуретан, поліпропілен, поліетилен) і природних твердих матеріалів, таких як частини рослин і каміння, були досліджені для колонізації мікроорганізмів без переробки біомаси, щоб збільшити їх утримання твердими речовинами і зменшити необхідну площу контакту.

Біоплівка може бути визначена як біоценоз мікроорганізмів, що складається з бактерій, найпростіших і грибків, які живуть разом на твердій поверхні. Ці мікроорганізми відповідають за вироблення позаклітинних полімерних речовин (ППР), що служать для стабілізації мікробної спільноти та сприяють адсорбції та накопиченню різних органічних і неорганічних речовин, включаючи пестициди, хлорфеноли, поліциклічні ароматичні вуглеводні та йони важких металів. Метаболічна активність, дифузійна здатність, пористість і щільність біоплівки визначають основними компонентами ППР, такими як ліпіди, нуклеїнові кислоти, білки та полісахариди.

Метою цієї роботи є визначення характеристик біоплівки на вибраному носії для очищення стічних вод.

Матеріали і методи

Дослідження було проведено на кафедрі біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології КПІ ім. Ігоря Сікорського.

Було використано пластмасовий носій діаметром 9,95 мм. Досліджували такі характеристики біоплівки, як концентрація біомаси, іммобілізованої на поверхні носія, питома біомаса на одиницю площі поверхні, для очищення господарсько – побутових стічних вод. Іммобілізацію мікроорганізмів на носіях проводили з використанням активного мулу, відібраного на Бортницькій станції аерації м. Києва, де відбувається очищення міських стічних вод міста Києва і прилеглих населених пунктів.

Аналіз біологічної плівки з поверхні носіїв, активного мулу проводили з використанням стандартних методів та методик.

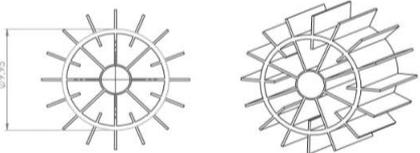
В якості експериментальної установки було використано біореактор, в якому дотримували умови проведення процесу нарощування біомаси на поверхні носіїв. В біореакторі на дні (в центрі) було встановлено аератор та по периферії дна – додатковий гнучкий аератор. Обидва забезпечували

дрібнобульбашкову аерацію за допомогою ідентичних компресорів. Для підтримання життєздатності та забезпечення мікроорганізмів біогенними речовинами додавали по 10 мл/день підживлювального (модельного) розчину в кожен біореактор. Склад такого розчину розраховували із співвідношення БСК:N:P=100:5:1 для підтримання активного мулу. До складу увійшли глюкоза як джерело карбону (органічна речовина), джерела біогенних елементів: азоту – KNO_3 , і фосфору – K_2HPO_4 . Після гідравлічних випробувань в біореактор вносили активний мул та носій. Пусковий період тривав 14 діб, після чого досліджували обростання носіїв у вигляді біологічної плівки.

Результати

Нарощування біомаси на носіях проводили з використанням мікроорганізмів активного мулу із забезпеченням їх киснем (повітря з системи аерації) і біогенними речовинами (модельний розчин). Було проведено дослідження характеристик біоплівки на пластикових елементах – носіях для прикріплення біоплівки, колісної форми, діаметром 9,95 мм (табл. 1). Досліджуваний носій відноситься до типу дисперсних, що розподіляються по всьому об'єму аеротенка. Для точного визначення геометричних параметрів було виконано 3D модель носія для розрахунку площі їх поверхні у програмному середовищі SolidWorks.

Таблиця 1. Характеристика досліджуваних носіїв для іммобілізації мікроорганізмів

| Фото носія | Діаметр носія, мм | Площа поверхні одного елемента носія, см ² | 3D моделі досліджуваних носіїв |
|---|-------------------|---|--|
|  | 9,95 | 20,83 |  |

Було досліджено наступні характеристики біоплівки на носії: концентрація біомаси, іммобілізованої на поверхні носія, та питома біомаса на одиницю площі поверхні завантаження для очищення господарсько – побутових стічних вод.

Важливим завданням досліджень носія є визначення та порівняння біомаси обростань на носії у створених в біореакторі експериментальної установки умовах. Дослідження щодо визначення величини біомаси обростань на носіях, розміщених в біореакторі, були проведені в трьох повтореннях (3 серії).

На рис. 1 наведено фотографії чистого носія та носія, висушеного з біоплівкою. Носії відрізняються зовнішньо за кольором, що може свідчити про кількість біомаси та товщину шару біоплівки. Різницю у забарвленні спостерігали для носія Ø 9,95 мм.

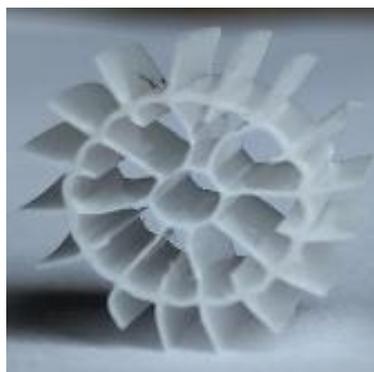


Фото носія до експерименту

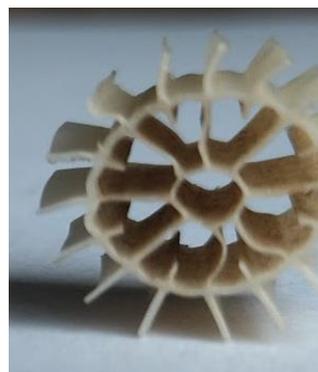


Фото висушеного з біоплівкою носія

Рис. 1. Фото зразків носіїв до експерименту та висушених із біоплівкою

В результаті було встановлено, що середня концентрація біомаси, іммобілізованої на поверхні носія, становила 5425 ± 10 мг/дм³. Питома біомаса на одиницю площі поверхні носія становила $0,83 \pm 0,06$ мг/см². Високу концентрацію біомаси на носії можна пояснити високорозвиненою зовнішньою поверхнею носія – площа поверхні одного елемента становить $20,83 \pm 0,5$ см², складною конфігурацією елемента носія (багато перегородок, ребер на зовнішній і внутрішній поверхнях колеса), малим розміром і великою кількістю елементів в об'ємі біореактора – 350 шт.

Важливу роль відіграє поведінка носія в біореакторі. Під дією дрібнодисперсних бульбашок повітря системи аерації окремі елементи носія $\varnothing 9,95$ мм рухаються в товщі води «зверху – вниз» і навпаки, добре омиваються активним мулом, що сприяє інтенсивнішому контакту мікроорганізмів активного мулу з поверхнею носія та швидкому утворенню й наростанню шару біоплівки на носії.

Висновки. Аналіз результатів проведених досліджень та сучасних публікацій в галузі очищення стічних вод показав перспективи використання технології біологічного очищення за участю іммобілізованих на носіях мікроорганізмів. До переваг такої технології слід віднести: високу ефективність видалення складних органічних речовин, процесів нітрифікації та денітрифікації; збільшення біомаси мікроорганізмів – очисників в одиниці об'єму очисної споруди; зменшення приросту біомаси та витрат на її утилізацію; зниження об'єму аеротенка та капітальних витрат; компактність очисних споруд; зниження вартості експлуатації завдяки меншим витратам енергії та реагентів.

Біотехнологія очищення стічних вод з використанням іммобілізованих мікроорганізмів є високоефективною, її досліджують і широко впроваджують в Україні та в європейських країнах як в традиційних технологіях (в діючих аеротенках на очисних станціях), так і в новітніх технологіях (в спеціальних біореакторах).

Вибір носія біоплівки є дуже важливим фактором, оскільки він впливає на оптимальну товщину біоплівки, ріст біомаси, ефективність біодеградації забруднювальних речовин різної природи тощо.

В результаті дослідження встановлено, що для носія Ø 9,95 мм усереднена концентрація біомаси, іммобілізованої на поверхні, була найбільшою – 5425 мг/дм³, що в 1,8 – 2,7 рази перевищує концентрацію в аеротенку (зазвичай 2 – 3 г/дм³).

Таким чином, носії колісної форми діаметром 9,95 мм можуть бути влаштовані в системах ММВР для ефективного очищення стічних вод, а також використані для вдосконалення роботи аеротенків шляхом їх модернізації – створення в них зон з носіями для підвищення ефективності очищення стічних вод від органічних речовин, сполук азоту, особливо на стадії нітрифікації, сполук фосфору та інших забруднювальних речовин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. L.A. Sabliy, V.S. Zhukova Efficient treatment of industrial wastewater using immobilized microorganisms Water Supply and Wastewater Disposal. Designing, Construction, Operation and Monitoring. – Monografie / Edited by Beata Kowalska, Dariusz Kowalski. – Wydawnictwo Politechniki Lubelskiej. – Lublin, 2022. – pp. 248 – 262. ISBN: 978 – 83 – 7947 – 507 – 0 <http://bc.pollub.pl/dlibra/publication/14017>
2. Sabliy L., Kuzminskiy Y., Zhukova V., Kozar M., Sobczuk H. New approaches in biological wastewater treatment aimed at removal of organic matter and nutrients / Ecol. Chem. Eng. S., 2019; 26 (2): 331 – 343. DOI: 10.1515/eces – 2019 – 0023
3. Zinatizadeh, Ali Akbar & Ghaytooli, E.. (2015). Simultaneous nitrogen and carbon removal from wastewater at different operating conditions in a moving bed biofilm reactor (MBBR): Process modeling and optimization. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. 53. 10.1016/j.jtice.2015.02.034.
4. Al – amshawee, S. K., Yunus, M. Y., & Azoddein, A. A. (2020). A novel microbial biofilm carrier for wastewater remediation. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 736(7), 072006. DOI:10.1088/1757 – 899X/736/7/072006
5. Gieseke, A., Purkhold, U., Wagner, M., Amann, R., & Schramm, A. (2001). Community structure and activity dynamics of nitrifying bacteria in a phosphate – removing biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(3), 1351 – 1362. DOI:10.1128/AEM.67.3.1351 – 1362.2001

1.14 ПОРІВНЯННЯ РУХОМИХ І НЕРУХОМИХ НОСІЇВ БІОПЛІВКИ РІЗНИХ КОНСТРУКЦІЙ ДЛЯ ОЧИЩЕННЯ СТІЧНИХ ВОД

Гриневич А. О., Саблій Л. А.

Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»
grinevich.andriy@lil.kpi.ua

В роботі виконано аналіз ефективності двох полімерних носіїв для іммобілізації мікроорганізмів – «Куля» та «Сітка», які застосовували для біологічного очищення господарсько – побутових стічних вод. Встановлено, що носій «Куля» забезпечує у середньому у 10,9 разів більшу концентрацію іммобілізованої біомаси в об'ємі реактора (870 мг/дм^3 проти 80 мг/дм^3), тоді як «Сітка» формує в 3 рази щільнішу біоплівку на одиницю площі поверхні ($1,43 \text{ мг/см}^2$ проти $0,48 \text{ мг/см}^2$).

Ключові слова: біотехнологія, асоціація мікроорганізмів, активний мул, біоплівка, іммобілізація мікроорганізмів, полімерні носії, стічні води, очищення стічних вод.

Сучасні проблеми забруднення природних водойм внаслідок скидання в них стічних вод зумовлюють необхідність підвищення ефективності біотехнологій очищення стічних вод, оскільки, попри значний розвиток галузі, близько 44 % стічних вод у світі досі відводяться у водні об'єкти без належного очищення. Провідну роль у сфері біологічного очищення нині відіграє технологія аеробного біологічного очищення з використанням асоціації мікроорганізмів – активного мулу, яку використовують більш ніж на 90 % очисних споруд [1]. Проте ефективність систем активного мулу характеризується значною варіабельністю під впливом температурних коливань, зміни рН, концентрації токсичних домішок, кисневого та гідравлічного режимів. Частими є явища спливання мулу, надмірного розвитку нитчастих бактерій та нестабільність процесів нітрифікації, що обмежує потенціал традиційних технологій та актуалізує пошук рішень щодо інтенсифікації біологічних процесів. Одним з найбільш перспективних напрямів удосконалення технології є підвищення концентрації біомаси в реакторі шляхом іммобілізації мікроорганізмів, тобто їх фіксації на твердій поверхні або у внутрішній структурі носія з метою збереження активності та захисту від зовнішніх впливів. Іммобілізовані системи забезпечують більшу щільність біомаси, покращують масообмін, підвищують стійкість до токсичних речовин і сприяють тривалому функціонуванню мікробних угруповань. Крім того, вони зменшують приріст надлишкового мулу, забезпечують утримання в біоплівці спеціалізованих груп бактерій за рахунок відсутності рециркуляції та дають можливість збільшити окисну потужність та зменшити розміри біореакторів порівняно з традиційними аеротенками [2–3].

Процеси утворення біоплівки лежать в основі більшості технологій із застосуванням іммобілізованих мікроорганізмів. Біоплівка являє собою складний біоценоз бактерій, грибів та найпростіших, об'єднаних позаклітинними полімерними речовинами (ППР), які виконують структурну, захисну і сорбційну функції. Властивості ППР – дифузійна проникність, міцність, еластичність і пористість – визначають продуктивність біоплівкової системи, швидкість перенесення маси і чутливість біоценозу до змін в навколишньому середовищі [4].

Критичним елементом у таких технологіях є носії для іммобілізації мікроорганізмів. Сьогодні розроблено широкий спектр носіїв із природних та синтетичних матеріалів – від жорстких структурованих блоків, щіткових та волоконних модулів до дисперсних полімерних елементів зі складною будовою зовнішньої поверхні. Форма поверхні, шорсткість, гідрофільність, питома площа поверхні, щільність, а також механічна та хімічна стабільність носія безпосередньо впливають на біоплівкоутворення, товщину біоплівки, об'єм активної біомаси та кінетику масообміну. Вдалий вибір носія дозволяє не лише ефективно утримувати повільноростучі нітрифікуючі бактерії, але й підвищувати стійкість системи до токсичних і гідравлічних впливів [5].

Попри суттєвий прогрес у створенні біоплівкових технологій, їх широке впровадження стримується низкою нерозв'язаних проблем, пов'язаних із забезпеченням рівномірного росту біоплівки, оптимальної товщини для масообміну, запобігання надмірному відриву біоплівки та створенням умов для адаптації носіїв до вибраного процесу очищення води. Тому порівняння різних типів носіїв за їх структурними, гідродинамічними та технологічними характеристиками є актуальним напрямом досліджень, спрямованим на оптимізацію параметрів процесів іммобілізації мікроорганізмів та досягнення стабільного й ефективного очищення стічних вод у змінних умовах експлуатації очисної станції.

Мета дослідження – порівняти ефективність та технологічні характеристики двох типів полімерних носіїв іммобілізованих мікроорганізмів для підвищення інтенсивності біологічного очищення господарсько – побутових стічних вод. **Об'єкт дослідження** – процеси формування та функціонування біоплівки у системах біологічного очищення стічних вод із використанням іммобілізованих мікроорганізмів. **Предмет дослідження** – конструктивні та функціональні характеристики двох типів полімерних носіїв (рухомого та стаціонарного) і їх вплив на ріст біоплівки та концентрацію біомаси.

Матеріали та методи дослідження

Іммобілізацію мікроорганізмів на носіях здійснювали з використанням активного мулу, відібраного на Бортницькій станції аерації м. Києва, де відбувається очищення міських господарсько – побутових стічних вод. Як модельне середовище застосовували відстояну водопровідну воду з додаванням активного мулу для забезпечення початкової концентрації сухої речовини відповідно до умов досліду. У

біореактори вносили активний мул для забезпечення у реакторі №1 дози 6,6 г/дм³, у реакторі №2 – 8,6 г/дм³.

Для оцінки формування біоплівки використовували стандартну методику визначення концентрації завислих речовин гравіметричним методом. Зважування зразків виконували на аналітичних терезах OHAUS Pioneer PA214C та OHAUS Scout Pro, висушування до сталої маси – у сушильній шафі Labexpert. Зольність визначали прожарюванням висушених зразків у муфельній печі. Для мікроскопічного аналізу структури біоплівки та дослідження індикаторних мікроорганізмів застосовували біологічний мікроскоп дослідницького класу ULAB XSP – 139TP з фото – відеофіксацією; використовували об'єктиви x4, x10, x20, x40 та окуляр x10.

Дослідження проводили в двох ідентичних експериментальних біореакторах, у кожному створювали однакові гідродинамічні умови для забезпечення процесу іммобілізації. Біореактори мали циліндричну форму діаметром 19,3 см та висотою 20 см. Робочий об'єм становив 4,2 дм³ при глибині води – 14,3 см. В реакторах було розміщено аератори – в центрі дна (точковий) і по периметру дна (гнучкий) для забезпечення інтенсивної дрібнобульбашкової аерації. Подачу повітря здійснювали компресорами Resun AIR 3000. Перед початком експерименту було проведено гідравлічні випробування на герметичність та працездатність обладнання.

У кожному біореакторі випробовували один із двох досліджуваних полімерних носіїв, що відрізнялися типом конструкції.

Таблиця 1. Досліджувані носії для іммобілізації мікроорганізмів

| № біореактора | Тип носія | Об'єм, зайнятий носієм, дм ³ | Площа поверхні одного елемента, см ² |
|---------------|---|---|---|
| 1 | «Куля» (дисперсний рухомий носій) | 1,17 | 153 |
| 2 | «Сітка» (стаціонарний структурований носій) | 3,66 | 213 |

Тривалість експерименту становила 20 діб. Експеримент проводили у трьох повторностях. Пусковий період (формування первинної біоплівки) становив 14 діб, після чого проводили оцінювання розвитку біомаси на поверхні носіїв та зміну морфологічних характеристик біоплівки.

Результати та обговорення

У ході експериментальних досліджень було оцінено формування біообростань на двох типах носіїв – «Куля» та «Сітка», за трьома серіями дослідів. Носії розміщували у біореакторах і витримували протягом 20–30 діб при стабільних умовах аерації та однаковому гідравлічному режимі. Всі визначення концентрації іммобілізованої біомаси виконували як у перерахунку на об'єм біореактора, зайнятий носієм (C_6 , мг/дм³), так і відносно площі поверхні носія (C , мг/см²). Фото носіїв із сформованими біообростаннями наведено на рисунках 1 та 2.



Рис. 1 Фото носія «Сітка» з обростанням біоплівкою



Рис. 2 Фото носія «Куля» з обростанням біоплівкою

Результати першої серії експериментів засвідчили суттєве формування біоплівки на обох типах досліджуваних носіїв. Концентрація біомаси на носії «Куля» становила $339,0 \text{ мг/дм}^3$ і $0,19 \text{ мг/см}^2$, тоді як для «Сітки» спостерігали нижчу концентрацію – $100,6 \text{ мг/дм}^3$, але значно більшу величину біомаси, закріпленої на одиниці площі – $1,73 \text{ мг/см}^2$. У другій серії досліджень спостерігали збільшення іммобілізації мікроорганізмів на обох носіях. На «Кулі» концентрація досягла $575,1 \text{ мг/дм}^3$ та $0,31 \text{ мг/см}^2$. На «Сітці» значення становили $61,28 \text{ мг/дм}^3$ та $1,18 \text{ мг/см}^2$. У третій серії експериментів, що тривала 19 діб, концентрація іммобілізованої біомаси зросла до $1694,7 \text{ мг/дм}^3$ і $0,93 \text{ мг/см}^2$ для типу «Куля» та до $78,62 \text{ мг/дм}^3$ і $1,38 \text{ мг/см}^2$ для носія «Сітка». Порівняння результатів трьох серій показало, що процес накопичення біомаси є стабільним та відтворюваним для обох типів носіїв.

Усереднення отриманих даних дозволило встановити інтегральну оцінку ефективності носіїв. Для носія «Куля» середня концентрація СВ становила 870 мг/дм^3 , тоді як для «Сітки» – 80 мг/дм^3 . Водночас при перерахунку на одиницю площі поверхні «Сітка» має перевагу – $1,43 \text{ мг/см}^2$ проти $0,48 \text{ мг/см}^2$ для «Кулі». Таким чином, сферичний носій є

більш результативним щодо можливого приросту біомаси в об'ємі біореактора, тоді як носій «Сітка» забезпечує більш щільне закріплення мікроорганізмів та може бути ефективним у процесах, де потрібна тонка та стабільна біоплівка. Загалом, отримані результати підтверджують принципові відмінності механізмів іммобілізації на різних геометричних структурах – на гладкій поверхні носія «Куля» біомаса накопичується переважно у товщі шару, тоді як «ниткова» конструкція «Сітки» сприяє компактному росту плівки з високим ступенем контакту мікроорганізмів з рідкою фазою. Це дозволяє говорити про потенційну доцільність застосування «Кулі» для інтенсифікації процесів очищення за рахунок більшої величини біомаси, а «Сітки» – для досягнення стабільної роботи біореактора та запобігання відриву біоплівки.

Висновки. Встановлено, що рухомий носій «Куля» забезпечує значно вищий приріст іммобілізованої біомаси у перерахунку на об'єм біореактора – у середньому 870 мг/дм³, що є приблизно у 11 разів більше, ніж для носія «Сітка» (80 мг/дм³). Натомість, стаціонарний носій «Сітка» формує у 3 рази щільнішу біоплівку на одиницю площі – 1,43 мг/см², у порівнянні з 0,48 мг/см² для носія типу «Куля». Це підтверджує принципові відмінності механізмів формування біоплівки залежно від конструкції носія та умов масообміну.

Рухомий носій «Куля» доцільно застосовувати для інтенсифікації технологій біологічного очищення за рахунок підвищення загальної концентрації активної біомаси в реакторі. Носій «Сітка» є перспективним для систем, де критичною є стабільність та рівномірність біоплівки, а також підвищена стійкість до зміни гідравлічних навантажень.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Sablii L., Zhukova V., Kozar M., Hrynevych A., Jaromin – Gleń K. Comparison biofilm characteristics on different types of carriers for wastewater treatment. *EP*. 2025. Vol. 10, № 1. P. 20–25. <https://doi.org/10.23939/ep2025.01.020>
2. An Y., Wang C., Miao P., Wang X., Liang J., Liu J. Improved decontamination performance of biofilm systems using carbon fibers as carriers for microorganisms. *New Carbon Materials*. 2018. Vol. 33, № 2. P. 188–192. [https://doi.org/10.1016/S1872-5805\(18\)60334-8](https://doi.org/10.1016/S1872-5805(18)60334-8)
3. Sabliy L., Kuzminskiy Y., Zhukova V., Kozar M., Sobczuk H. New approaches in biological wastewater treatment aimed at removal of organic matter and nutrients. *Ecological Chemistry and Engineering*. 2019. Vol. 26, № 2. P. 331–343. <https://doi.org/10.1515/eces-2019-0023>
4. Widjaya R., Faizal F., Subhan U., Hidayat S., Hermawan W., Joni I.M., Panatarani C. A coin – shaped polypropylene bio – carrier fabricated using a filament – based 3D printer for wastewater treatment. *Applied Mechanics and Materials*. 2023. Vol. 916. P. 55–61. <https://doi.org/10.4028/p-ojyuu4>
5. Zhang J., Wang H., Shao Y., Liu G., Qi L., Dang W., Yuan J., Li Y., Xia Z. Analysis on common problems of the wastewater treatment industry in urban China. *Chemosphere*. 2022. Vol. 291, Part 2. P. 132875. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132875>

1.15 ВИКОРИСТАННЯ ЛИПКОГЕННИХ КОМПОЗИЦІЙ НА ОСНОВІ ПРЕПАРАТУ ЕПАА – М ПРИ РОЗРОБЦІ БІОПРЕПАРАТІВ ДЛЯ РОСЛИННИЦТВА.

Кирилов В. О.^{1,2}, Юр'єва О. М.³, Савчук Я. І.³,
Данкевич Л. А.³, Леонова Н. О.³

¹Інноваційна компанія Біоінвест – Агро, Україна

²Київський національний університет технології і дизайну, Україна

³Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України
v.kirillov@ukr.net

*У роботі досліджено вплив липкогенних композицій на основі ЕПАА – М на збереження титру штаму мікроміцетів *Trichoderma viride* ІМВ F – 100162 та загального титру препарату Ековітал з метою розробки в подальшому гельних форм даних препаратів.*

Ключові слова: ЕПАА – М, мікроміцети роду *Trichoderma*, Ековітал, гельних форм препаратів, титр.

Технологія виробництва біопрепаратів для рослинництва передбачає використання деяких заходів, які дозволять підвищити їх якість. Одним із необхідних вимог до якості мікробних препаратів є їх здатність зберігати високий титр біоагенту протягом тривалого часу. Це можна досягти зміною компонентного складу середовища для вирощування мікроорганізмів.

Використання біопрепаратів на твердих субстратах – носіях пов'язано з деякими труднощами, зокрема із сільськогосподарською технікою та втратою титру препарату під час фільтрації сипучих матеріалів. А недоліком рідких препаратів є обмежений термін збереження культури у деяких випадках не більше 14 – 20 діб. Перспективною формою для отримання препаратів для землеробства є гельна форма. Тому, при розробці таких препаратів у якості компонентів поживних середовищ чи просто компонентів середовищ можна використовувати полісахариди рослинного, тваринного, мікробного походження або інші згущувачі [1].

Препарат ЕПАА – М це біологічний гель, який створено на основі мікробного полісахариду ксампану та деяких безпечних хімічних компонентів [7]. Він вже тривалий час використовується у агротехнологіях і порівняно з іншими аналогами має наступні переваги: фіксує корисну для рослин мікробіоту; допомагає рослинам переносити посуху та стреси; ефективно підвищує стійкість рослин до заморозків; продовжує тривалість дії пестицидів, стимуляторів росту; продовжує тривалість дії корисних бактерій, що входять до складу мікробних препаратів; добре розчиняється у воді і має високу клейову здатність; підвищує стійкість рослин до корневих гнилей, сажкових хвороб тощо; збільшує ефективність пестицидів; дозволяє зменшити норми витрат пестицидів на 25% і більше;

дозволяє зменшити кількість обробок рослин пестицидами у 2 і більше разів; стимулює ріст рослин; утворює міцні плівки на рослинах, не перешкоджаючи газообміну рослин [1, 7]. Останнім часом, нами розпочато інтенсивне випробування використання у агробіотехнологіях гелевих форм мікробних біопрепаратів, що містять липкогенні композиції на основі прилипаєча ЕПАА – М [1, 4, 5, 8]. Зокрема, підтверджено ефективність використання липкогенних композицій на його основі для розробки гельних форм препаратів. Так, попередньо нами досліджено вплив липкогенних композицій на основі ЕПАА – М на процеси спороутворення та синтезу білка ентомопатогенними штамми *Bacillus thuringiensis* та запатентовано гельну форму цього препарату [4, 5]. Попередньо нами показано, що *Pantoea agglomerans* П324 є компонентом епіфітної популяції пшениці. Сапрофітний штам *P. agglomerans* не має антагоністичної активності до фітопатогенних бактерій різних, видів, в тому числі до основного збудника бактеріозу пшениці *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* але може колонізувати рослину і може бути перспективним для захисту рослин від фітопатогенів, за рахунок конкурентної боротьби. Було показано, що додавання препарату ЕПАА дозволяє зберегти титр препарату на високому рівні тривалий період [1].

За даними літератури серед біопрепаратів, які створено на основі штамів грибів, чільне місце посідають види роду *Trichoderma*. Відмічають наступні переваги штамів *Trichoderma*: здатність до синтезу низькомолекулярних речовин з антибіотичною активністю, що у поєднанні з мікопаразитизмом на фітопатогенних мікроміцетах і синтезом хітинолітичних ферментів, зумовлює їх високий антагоністичний потенціал; утворення конідій, що можуть упродовж тривалого часу зберігати життєздатність за несприятливих умов навколишнього середовища; висока швидкість росту штамів *Trichoderma*; здатність рости на субстратах (грунтах) з кислим рН; синтез фітогормональних речовин – стимуляторів росту рослин. Саме завдяки такому набору корисних властивостей препарати з активними штамми роду *Trichoderma* посідають провідне місце на ринку біопрепаратів. Зазвичай препарати виготовляються у рідкій формі [2, 6, 12].

Препарат Ековітал містить симбіотичні азотфіксувальні (*Bradyrhizobium japonicum*) та фосфатмобілізувальні бактерій (*Bacillus megaterium*). Ековітал призначений для комплексної передпосівної інокуляції насіння бобових культур (сої, гороху, нуту, люцерни, люпину, козлятнику, квасолі, буркуну, кормових бобів, конюшини, лядвенцю, вики, сочевиці, тощо) в умовах органічного та інтегрованого землеробства. Екологічно безпечний високоефективний інокулянт з унікальним поєднанням азотфіксувальних, фосфатмобілізувальних, рістрегулювальних та імунопротекторних властивостей мікроорганізмів, має позитивну післядію на мікробіоту і родючість ґрунтів. Препарат виготовляють і застосовують для кожної бобової культури окремо, оскільки певні види бульбочкових бактерій утворюють бульбочки і фіксують азот лише на

коренях рослини – господаря. Крім корисних живих бактерій, біопрепарат містить природний збалансований комплекс фізіологічно активних продуктів метаболізму ризобій і бацил: вітаміни групи В, фітогормони стимулювальної дії (ауксини, цитокиніни, гібереліни), ферменти, амінокислоти, органічні кислоти, полісахариди, антибіотичні речовини щодо фітопатогенних бактерій і грибів та ін. Наразі препарат виробляється у рідкій формі [3, 8].

Постановка завдання

Зважаючи на все зазначене вище, нами було досліджено вплив липкогенних композицій на основі ЕПАА – М на збереження титру штаму мікроміцетів *Trichoderma viride* ІМВ F – 100162 та загального титру препарату Ековітал з метою розробки в подальшому геліних форм даних препаратів.

Результати досліджень

У дослідженнях використали наступні липкогенні композиції: А–30 % ЕПАА – М та 70 % ксампану, В–70 % ЕПАА – М та 30 % ксампану, С–80 % ЕПАА – М та 20 % ксампану, D–50 % ЕПАА – М та 50 % ксампану, Е–30 % композиції В та 70 % ксампану, нативний ЕПАА – М, ксампан. Для розробки липкогенних композицій використовували модифікований сополімер ЕПАА – М, отриманий шляхом полімеризації акриламід у полісахариду ксантану за наявності окислювача та цільової добавки діаміну вугільної кислоти, що перешкоджає його забрудненню супутньою мікробіотою при зберіганні [7]. У дослідженнях використали препарат Ековітал – комплексний вискоєфективний поліфункціональний препарат на основі симбіотичних азотфіксувальних (*Bradyrhizobium japonicum* В – 6036 – для сої) та фосфатмобілізувальних бактерій (*Bacillus megaterium* В – 5724), призначений для передпосівної обробки насіння бобових культур з вихідним титром ($3 - 5 \cdot 10^9$ клітин/мл.) [3]. Штам *Bradyrhizobium japonicum* В – 6036 культивували на манітно – дріжджовому середовищі протягом 4 діб за 28°C, а штам *Bacillus megaterium* В – 5724 на пептонному середовищі протягом 1 доби за 28°C. Штами змішували у пропорції 4:1. Також у дослідженнях використали штам мікроміцету *Trichoderma viride* ІМВ F – 100162, що є перспективним для подальшого використання у біотехнологіях, оскільки має високий рівень антагоністичної і фітостимулювальної властивостей [2, 6, 11, 12]. Штам культивували на сусло – агарі з подальшим змиванням міцелію стерильним фіз. розчином до вихідного титру 1×10^6 конідій/мл. Суспензію штаму мікроміцетів змішували у співвідношеннях: липкогенна композиція (А, В, С, D, Е)/ нативний ЕПАА – М/ ксантан – 30%, + *Trichoderma viride* ІМВ F – 100162 – 70%; липкогенна композиція (А, В, С, D, Е)/ нативний ЕПАА – М/ ксантан – 40% + *Trichoderma viride* ІМВ F – 100162 – 60%; липкогенна композиція (А, В, С, D, Е)/ нативний ЕПАА – М/ ксантан – 50% + *Trichoderma viride* ІМВ F – 100162 – 50%; липкогенна композиція (А, В, С, D, Е)/ нативний ЕПАА – М/ ксантан – 60% + *Trichoderma viride* ІМВ F – 100162–40%; липкогенна композиція (А, В, С, D, Е)/ нативний

ЕПАА – М/ ксантан – 70% + *Trichoderma viride* IMB F – 100162 – 30%.

Визначення титру бактерій у вихідних зразках препарату Ековітал проводили у камері Тома – Горяєва. Розрахунки проводили у 10 великих квадратах, з п'ятикратною повторністю, попередньо отримавши серію розведень проби, так щоб у одному великому квадраті кількість об'єктів не перевищувала 16. Титр обраховували за формулою: $X \cdot 5 \cdot 1000 = Y$ де X – кількість у 1 квадраті, а Y – кількість клітин у 1 мл рідини [9]. Також титр Ековітал та *Trichoderma viride* перевіряли шляхом висіву суспензії на агаризовані поживні середовища. Для цього готували серію розведень досліджуваних зразків гельних препаратів. По 0,1 – 1 мл такої рідини (або розведеної проби) висівали на поверхню твердого поживного середовища (сусло агар *Trichoderma viride*, пептонне середовище – *Bacillus megaterium*, манітно – дріжджове – *Bradyrhizobium japonicum*) в стерильних чашках Петрі. Мікроорганізми інкубували у термостаті при відповідній температурі до появи росту. Після інкубації підраховували кількість сформованих колоній на чашках. Кількість колоній перераховували на одиницю об'єму або маси вихідного матеріалу, визначаючи таким чином титр (кількість мікроорганізмів) [9].

Показано, що додавання до рідких форм мікроорганізмів липкогенних композицій на основі ЕПАА – М та ксампану, в цілому позитивно впливало на збереження титру як препарату Ековітал так і *T. viride*. Зокрема, найкраще на збереження титру як препарату Ековітал так і *T. viride* впливало додавання липкогенної композиції А (30 % ЕПАА – М та 70 % ксампану) та липкогенної композиції Е (30 % композиції В та 70 % ксампану). Зокрема, титр *T. viride* після 12 місяців зберігання з додаванням липкогенної композиції А склав від 2×10^3 до 2×10^6 конідій/мл, порівняно з контрольними показниками за аналогічний період (2×10^2 конідій/мл). Додавання липкогенної композиції Е дозволило зберегти титр *T. viride* протягом 12 місяців на рівні від 1×10^3 до 5×10^6 конідій/мл, порівняно з контрольними зразками зазначеними вище. Титр препарату Ековітал після 12 місяців зберігання складає за додавання липкогенної композиції А від $2 - 3 \times 10^4$ до $3 - 5 \times 10^6$ КУО в мл, а за додавання липкогенної композиції Е — від $2 - 3 \times 10^5$ до $3 - 5 \times 10^7$ КУО в мл. Титр контрольного зразка після 12 місяців зберігання становив $1 - 2 \times 10^4$ КУО в мл. Натомість вплив різних співвідношень липкогенних композицій та мікроорганізмів варіював для різних фізіологічних груп мікроорганізмів. Так, найкраще на збереження титру *T. viride* впливали наступні варіанти дослідів: 50% липкогенної композиції +50% *T. viride* та 60% липкогенної композиції +40% *T. viride*. Натомість, збільшення концентрації липкогенної композиції до 70% та 90% не призводить до кращого збереження титру *T. viride* протягом дослідженого періоду. Крім того, не дуже високий вміст від липкогенних композицій (30% – 40%) в суміші також не дуже позитивно впливав на збереження титру *T. viride*. У випадку препарату Ековітал оптимально на збереження титру впливало додавання від 30% до 40% липкогенних композицій. Збільшення концентрації липкогенних композицій у

середовищі культивування не призводило до кращого збереження титру препарату Ековітал. Отримані нами результати узгоджується з даними літератури [4, 5]. Так, попередньо показано, що еталонний штам *B. thuringiensis* 98 характеризувався найвищим рівнем синтезу білка за концентрації 10 % липкогенної композиції Е, в той час як колекційні штами *B. thuringiensis* 0239, 0293 та 0297 синтезували найбільше білка при 15 % концентрації липкогенної композиції Е у середовищі культивування. Автори наголошували, що для всіх досліджених штамів *B. thuringiensis* введення 20 % липкогенної композиції Е в середовище культивування призводило до зниження кількості білка, що продукується, а в окремих випадках і кількості спор. Крім того, додавання до середовища культивування *B. thuringiensis* 0239 та 0297 15 % липкогенної композиції Е призводило до незначного підвищення кількості білка (на 2,2–8,5 %) порівняно з введенням 10 % концентрації даної композиції. Автори показали, що використання липкогенної композиції Е приблизно у 1,6–2,4 рази покращувало синтез білка та у 1,0–1,9 рази збільшувало кількість спор дослідженими штамми порівняно з контролем. Крім того, серед усіх використаних композицій перспективною на думку дослідників була липкогенна композиція А [5]. Також показано що при формуванні гельного субстрату для глибинного періодичного культивування ризобій сої та нуту даний препарат (ЕПАА) не впливає на морфологічні властивості штамів *B. japonicum*. Для їх культивування доцільно використовувати 5% ЕПАА від об'єму середовища, порівняно з контролем. Встановлено, що титри *B. japonicum* в гельному препараті за 4 місяці зберігання знизились в 2 – 3 рази, але залишалися при цьому на достатньо високому рівні. При додаванні в гельний препарат регуляторів росту рослин Івіну та Біосилу життєздатність бульбочкових бактерій сої через 50 діб зберігання препарату перевищувала контрольний показник відповідно в 2,2 рази та 1,4. рази. Автори констатують, що для збереження титру бульбочкових бактерій доцільно використовувати 5% ЕПАА від об'єму середовища, а також композицію препарату ЕПАА – ЕПАА – Е. При цьому термін зберігання титру бактерій подовжується до 3 – 4 місяців в залежності від штамму [8].

Висновки. Отже, додавання до рідких форм мікроорганізмів липкогенних композицій на основі ЕПАА – М та ксампану в цілому позитивно впливало на збереження титру як препарату Ековітал, так і *T. viride* протягом тривалого періоду. Найкраще на збереження титру *T. viride* впливало додавання липкогенних композицій А (30 % ЕПАА – М та 70 % ксампану) та Е (30 % композиції В та 70 % ксампану) у діапазоні від 50 до 60%. Додавання липкогенних композицій А (30 % ЕПАА – М та 70 % ксампану) та Е (30 % композиції В та 70 % ксампану) у концентрації від 30 до 40% також найкраще впливали на збереження титру препарату Ековітал.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Біологічний препарат ЕПАА в інтегрованій системі захисту рослин: методичні рекомендації під редакцією академіка НААН В.П. Патики./ Данкевич Л.А., та ін. Київ: ТОВ «АРТ – Мілл», 2023. 37 с.
2. Каганюк П.П., Савчук Я.І. Антагоністична активність штамів штамів *Trichoderma* щодо деяких токсигенних *Aspergillus* spp. Доповіді XVI з'їзду Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського: збірник тез, Київ, 2 – 6 червня 2025 року, С 35
3. Комплексний мікробний препарат Ековітал для інокуляції насіння бобових культур: пат. 101388 UA *Україна*: МПК (51) (2013.01) C05F 11/00, C12P 39/00; заявл. 28.08.2012. опубл. 25.03.2013, Бюл. № 6.
4. Круть В.В., Воцелко С.К., Патица В.П. Вплив різних липкогенних композицій на основі ЕПАА – М на синтез білка колекційними штамми *Bacillus thuringiensis*. Доповіді XII з'їзду товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського: збірник тез, Ялта 1 – 6 жовтня. С 175.
5. Круть В.В., та ін. Вплив різних липкогенних композицій на спороутворення та синтез білка колекційними штамми *Bacillus thuringiensis*. *Мікробіологічний журнал*. 2014. 76(5). С. 34–41.
6. Савчук Я.І., та ін. Фітотоксична активність відібраних штамів *Trichoderma* spp. з широким спектром антагоністичної активності. Доповіді XVI з'їзду Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського: збірник тез, Київ, 2 – 6 червня 2025 року. С 253
7. Спосіб одержання легкорозчинного співполімеру поліакриламід («ЕПАА – М»): пат. UA 60637 UA *Україна*: C08F 120/00 заявл. 26.01. 2011. опубл. 25.06.2011. Бюл. № 12.
8. Титова Л.В., та ін. Роль липкогенних компонентів в підвищенні фізіологічної активності ризобій и продуктивності соєво – ризобіального. *Мікробіологічний журнал*. 2012. 74(6), С 9–16.
9. Фітопатогенні бактерії. Методи досліджень: монографія / В.П. Патица та ін. Вінниця: Віндрук, 2017. 432с.
10. Штам бактерій *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* В – 7831 як основа препарату для боротьби з колорадським жуком: 139910.UA *Україна*: МПК C12N1/02 C12N5/07 C12N9/54 C12R1/07; заявл. 10.07.2019 опубл. 27.01.2020 Бюл.№2
11. Штам мікроскопічного гриба *Trichoderma viride* IMB F – 100162 з комплексом антагоністичної, гідролітичної і фітостимулювальної активностей: пат. UA 128871 C2 *Україна*: C12N 1/14 (2006.01), C12R 1/885 (2006.01), A01N 63/38 (2020.01). №а 2021 06840; заявл. 01.12.2021; опубл. 13.11.2024, Бюл. № 46. 6 с.
12. Sazonova K., Savchuk Y. Antifungal potential of exometabolites from *Trichoderma* strains against phytopathogenic micromycetes. Modern aspects of microbiology, virology and biotechnology in wartime and post – war period: conference materials, Kyiv, 15–16 November. 2023.P. 212–214.

1.16 ОЦІНКА ФУНКЦІОНАЛЬНОГО ПОТЕНЦІАЛУ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДІВ АНТАРКТИЧНИХ ЕКСТРЕМОФІЛІВ ЕКСТРАГОВАНИХ РІЗНИМИ МЕТОДАМИ

Юнгін О. С., Калініченко О. О., Морін В. В., Резнік Д. І., Охмат О. А.

Київський національний університет технологій та дизайну, Україна
olgaungin@gmail.com

Основна мета даної наукової роботи полягає у вивченні та оцінюванні відомих методів виділення й очищення мікробних екзополісахаридів (ЕПС). Дослідження сфокусоване на порівняльному аналізі ефективності різних протоколів екстракції ЕПС, синтезованих антарктичними екстремофільними штамми, а також на характеристиці фізико – хімічних властивостей отриманих полімерів (в'язкість, поверхневий натяг, густина). Кінцевою метою є визначення функціонального потенціалу цих ЕПС для подальшого використання у хімічній технології та біомедичних галузях (наприклад, як гідроколоїдів, біосурфактантів чи гелеутворювачів).

Ключові слова: *біоплівки, ЕПС, мікроорганізми екстремальних екосистем, екстракція, поверхневий натяг.*

Мікроорганізми є джерелом численних біотехнологічних продуктів завдяки їхній метаболічній різноманітності та простоті культивування. Одним із таких продуктів є екзополісахариди або ЕПС [1]. Ці полімери широко застосовуються в різних галузях промисловості, що зумовлено їхніми відмінними фізико – хімічними властивостями, нетоксичністю, біосумісністю, біодеградабельністю та легкістю отримання [2]. Мікробні полісахариди поділяються на два основні типи: внутрішньоклітинні полісахариди, т.з. інтрацелюлярні, та позаклітинні полісахариди, т.з. екстрацелюлярні. Позаклітинні полісахариди, у свою чергу, класифікуються на капсульні полісахариди, які формують капсулу, що оточує мікроорганізми, та екзополісахариди, які секретуються у навколишнє середовище [3].

Екстремофіли – це мікроорганізми, які здатні виживати у суворих умовах навколишнього середовища, в т.ч. ті, що характеризуються екстремальними температурами, рівнями рН, солоністю та тиском [4]. Такі мікроорганізми еволюційно виробили унікальні адаптивні механізми, серед яких ключовим є синтез спеціалізованих ЕПС, що дозволяє їм виживати та активно розмножуватися у таких нішах, як гідротермальні джерела, гіперсолоні озера та кислі шахтні стоки [5]. Завдяки наявності значної кількості гідроксильних груп, мікробні екзополісахариди тривалий час використовуються як гідроколоїди, які модифікують реологію системи шляхом зміни її плинності та текстури. Так, наприклад, у харчовій промисловості та індустрії засобів особистої гігієни вони виконують роль

згущувачів, желювальних агентів, стабілізаторів, емульгаторів та водозв'язувальних речовин. Мікробні ЕПС привабливі також і для косметології завдяки їхнім антиоксидантним та водопоглинальним властивостям.

Екзополісахариди, продуковані екстремофільними мікроорганізмами, особливо цінні завдяки їхній структурній складності, біодеградабельності, біосумісності та різноманітній біологічній активності. Ці характеристики роблять їх надзвичайно привабливими для широкого спектра промислових та біомедичних застосувань [6,7]. Наприклад, ці біополімери часто демонструють виняткову стабільність та біоактивність в екстремальних умовах, що суттєво відрізняє їх від ЕПС, продукованих мезофільними організмами. Це позиціонує їх як «зелене золото» біотехнології [8]. Дослідження мікроорганізмів екстремальних екосистем відкриває численні можливості для отримання продуктів з перспективою використання в різних сферах промисловості. Так, наприклад, такі мікроорганізми можуть забезпечувати захист кератиноцитів від пошкоджень, спричинених температурою або радіацією [9]. Мікробні ЕПС мають широкий спектр біоактивності, включаючи протипухлинні, антиоксидантні, імуномодулюючі, противірусні, антибактеріальні, протизапальні та холестеринознижувальні властивості [10]. У фармацевтичних препаратах ЕПС використовуються як допоміжні речовини для контрольованого вивільнення ліків, покриття пігулок або як стабілізатори суспензій. Наявність гідроксильних і карбоксильних груп дозволяє проводити структурну модифікацію ЕПС, підвищуючи їхню біостабільність і механічні властивості [11]. Створюються також антибактеріальні гідрогелі на основі модифікованих ЕПС таких як хітозан, декстран для прискореного загоєння ран [12].

Метою нашої роботи було оцінювання фізико – хімічних параметрів ЕПС, синтезованих двома штамми бактерій, асоційованих з антарктичними рослинами – *Hafnia psychrotolerans* 25.2 та *Pseudomonas sp.* 39.4. ЕПС було екстраговано різними методами задля виявлення їхньої специфічної функціональної корисності у хімічній технології. Об'єкт дослідження – ЕПС, синтезовані бактеріальними штамми, асоційованими з антарктичними рослинами. Предмет дослідження – фізико – хімічні та функціональні властивості ЕПС у залежності від умов культивування та методу екстракції.

Матеріали та методи

Бактеріальні штами, використані в дослідженні, були виділені з *D. antarctica* та *C. quitensis*, що були відібрані під час 25 Української антарктичної експедиції (січень – квітень 2020 р.) вздовж Західної частини Антарктичного півострова, культивувалися в стаціонарних умовах протягом шести діб за 25°C та 37°C для стимуляції формування біоплівки та синтезу ЕПС. Було використано два типи поживних середовищ поживний бульйон (Nutrient Broth, NB) виробництва HiMedia Ltd. та мінімальне сольове середовище (Minimal Salt Media, MSM). Після завершення культивування

було здійснено розділення культур на дві основні фракції для подальшої екстракції позаклітинних полімерів – фракція біоплівки та планктону. Біоплівки збирали механічним шляхом за допомогою наконечників для піпеток об'ємом 1000 μ л. Клітини, що перебували у планктонному стані в культуральному середовищі, були відокремлені шляхом центрифугування при 4000 об/хв протягом 10 хвилин.

Зібрані зразки піддавали трьом різним протоколам екстракції для вилучення екзополісахаридів: 1) кислотна екстракція [13]; 2) екстракція формамідом [14]; 3) екстракція ЕДТА [15]. Для охарактеризування отриманих зразків ЕПС були визначені ключові фізичні та хімічні показники, такі як рН, густина, відносна в'язкість, поверхневий натяг з використанням стандартних протоколів.

Результати

Фракція біоплівки обох досліджуваних штамів культивованих у поживному бульйоні за 25°C та екстрагованих без попереднього кислотного гідролізу, продемонструвала найбільш перспективні значення як для показника в'язкості, так і для показника густини. Це свідчить про високу молекулярну масу та структурну цілісність отриманих полімерів. Штам *Pseudomonas sp.* 39.4 (особливо фракція біоплівки в NB при 25°C) є абсолютним лідером за реологічними властивостями. Екстракція без кислотного кроку виявилася найбільш ефективною для отримання високов'язких полімерів.

Низький поверхневий натяг (наближений до показників контролю NB або нижче) вказує на потенціал ЕПС як біосурфактантів або емульгаторів. Високий поверхневий натяг (наближений до показників води або вище) може свідчити про високу гідрофільність або менший вміст полімеру. Найвище значення поверхневого натягу було зафіксовано для ЕПС, екстрагованого формамідом із планктонної фракції штаму *Hafnia psychrotolerans* 25.2, культивованого на MSM. Високий поверхневий натяг може вказувати на переважання в цьому зразку полімерів зі значною кількістю гідрофільних груп.

Цікаво, що деякі досліджувані зразки виявляли суперечливі результати для інтерпретації. Так, наприклад, зразок біоплівки штаму *Hafnia psychrotolerans* 25.2 екстрагованого без попереднього кислотного гідролізу був занадто щільним для вимірювання. Зразок перетворився на щільний гель або настільки в'язкий розчин, що стандартні прилади не змогли виміряти параметри. Це може бути найбільш перспективний зразок для застосувань, де потрібне сильне гелеутворення (наприклад, тканинна інженерія, стабілізація ґрунтів). Крім того, коричневий колір зразку (це єдиний зразок такого кольору) може вказувати на наявність побічних продуктів (наприклад, присутність меланоїдинів), що може бути пов'язано з високою концентрацією полімеру чи його хімічною модифікацією [16].

Також було показано на основі встановлених даних, що методика екстракції з ЕДТА загалом призводила до найнижчої в'язкості та помірного поверхневого натягу, що характерно для полісахаридів, які

міцно зв'язані з клітиною і мають меншу молекулярну масу або складнішу структуру.

Висновки. Ендофітні бактерії, ізольовані з екстремальних природних середовищ, мають високий потенціал для синтезу екзополісахаридів, які можуть бути використані у подальшому промисловому застосуванні. Їхня здатність продукувати ЕПС зі специфічними реологічними та фізико – хімічними властивостями робить їх цінним джерелом для хімічної технології.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Kumawat T. K., Kumawat V., Sharma S., Kandwani N., Biyani M. Applications of EPS in environmental bioremediations. In: Microbial Exopolysaccharides as Novel and Significant Biomaterials. Cham: *Springer International Publishing*, 2021. P. 285–302.
2. Abarquero D., Renes E., Fresno J. M., Tornadijo M. E. Study of exopolysaccharides from lactic acid bacteria and their industrial applications: a review. *International Journal of Food Science and Technology*. 2022. Vol. 57, No. 1. P. 16–26.
3. Jyoti K., Soni K., Chandra R. Optimization of the production of exopolysaccharide (EPS) from biofilm – forming bacterial consortium using different parameters. *The Microbe*. 2024. Vol. 4. P. 100117.
4. Upadhyaya C., Patel H., Patel I., Upadhyaya T. Extremophilic Exopolysaccharides: Bioprocess and Novel Applications in 21st Century. *Fermentation*. 2025. Vol. 11, No. 1. P. 16.
5. Banerjee A., Sarkar S., Govil T. et al. Extremophilic exopolysaccharides: biotechnologies and wastewater remediation. *Frontiers in Microbiology*. 2021. Vol. 12. P. 721365.
6. Qi M., Zheng C., Wu W., Yu G., Wang P. Exopolysaccharides from marine microbes: source, structure and application. *Marine Drugs*. 2022. Vol. 20, No. 8. P. 512.
7. Pirog T., Voronenko A. Ways for increasing the efficiency of technologies for the synthesis of microbial exopolysaccharides. Part 1. *Establishing optimal conditions for biosynthesis*. 2023.
8. López – Ortega M. A., Rodríguez – Hernández A. I., Chavarría – Hernández N. et al. Extracellular Polysaccharide Synthesized by the Halophilic Bacterium *Salibacterium halochares* STm, Isolated from Gypsum Dunes: Production, Physicochemical Characterization and Emulsifying Properties. *Journal of Polymers and the Environment*. 2022. Vol. 30, No. 5. P. 2050–2065.
9. Radchenkova N., Yaşar Yıldız S. Advanced optimization of bioprocess parameters for exopolysaccharides synthesis in extremophiles. *Processes*. 2025. Vol. 13, No. 3. P. 822.
10. Wao A. A., Singh S., Pandey A. et al. Microbial exopolysaccharides in the biomedical and pharmaceutical industries. *Heliyon*. 2023. Vol. 9, No. 8.
11. Peng S., Hu A., Ai J., Zhang W., Wang D. Changes in molecular structure of extracellular polymeric substances (EPS) with temperature in relation to sludge macro – physical properties. *Water Research*. 2021. Vol. 201. P. 117316.
12. Ravindran A., Manivannan A. C., Bharathi G. S. J. et al. Production and characterization of exopolysaccharide (EPS) from marine *Bacillus halotolerans* and its antibacterial activity against clinical pathogens. *Biologia*. 2024. Vol. 79, No. 2. P. 605–619.
13. Shen L., Cheng J., Wang J. et al. Comparison of extraction methods for extracellular polymeric substances (EPS) and dynamic characterization of EPS from sessile microorganisms during pyrite bioleaching. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2022. Vol. 10, No. 3. P. 107922.

14. Wenyan W., Lan W., Ru W., Liangwei D. Comparative Study on the Extraction Methods of Extracellular Polysaccharides Substances from Anammox Sludge. *Environmental Science & Technology (1003 – 6504)*. 2021. Vol. 44, No. 12.
15. Ou B., Hu X., Yu W. et al. Critical evaluation of extracellular polymeric substances extraction methods: Extraction efficiency, molecular characteristics, and heavy metals binding properties. *Science of The Total Environment*. 2025. Vol. 959. P. 178345.
16. Rehman Z. U., Vrouwenvelder J. S., Saikaly P. E. Physicochemical properties of extracellular polymeric substances produced by three bacterial isolates from biofouled reverse osmosis membranes. *Frontiers in Microbiology*. 2021. Vol. 12. P. 668761.

1.17 ВПЛИВ НАНОСРІБЛА НА БІОСИНТЕЗ МОЛОЧНОЇ КИСЛОТИ

Гусейнова К. Е.¹, Петрух А. О.¹, Золотар О. С.¹,
Шкотова Л. В.², Волошина І. М.¹

¹Київський національний університет технологій та дизайну, Україна

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
wirn@ukr.net

Досліджено вплив різних концентрацій (0,01–5 мМ) AgNPs на накопичення біомаси *Lactobacillus acidophilus* УКМ В – 2691 та здатність інтенсифікувати біосинтез молочної кислоти. Встановлено, що низькі концентрації AgNPs (0,01–0,05 мМ) проявляють стимулювальний вплив на накопичення біомаси та біосинтез молочної кислоти, тоді як концентрації 0,1 – 5 мМ проявляють токсичну дію.

Ключові слова: молочна кислота, наносрібло, молочнокислі бактерії, біосинтез, наночастки, *Lactobacillus acidophilus*.

Молочна кислота – це органічна сполука, яку можна отримувати біологічним шляхом за допомогою мікроорганізмів. Для виробництва молочної кислоти (МК) найчастіше використовують молочнокислі бактерії, серед яких провідне місце займають представники роду *Lactobacillus*, оскільки характеризуються гомоферментативним типом бродіння. Також, у літературі зазначено, що продуцентами молочної кислоти можуть бути також генетично – модифіковані бактерії *Bacillus* spp., *Corynebacterium glutamicum* та *Escherichia coli*. Крім того, деякі мікроміцети, зокрема *Rhizopus* spp., здатні використовувати у своєму метаболізмі різноманітні відновлювані джерела вуглецю, проявляючи високу амілолітичну активність, що сприяє синтезу молочної кислоти. Дріжджі, хоча й не продукують її у значних кількостях, вирізняються високою стійкістю до екстремальних умов середовища та можуть бути удосконалені методами генної інженерії для підвищення продуктивності [1, 2].

Молочна кислота є важливою сполукою, що знаходить широке застосування в різних галузях промисловості, зокрема у медицині, харчовій, косметичній та фармацевтичній сферах. Наразі актуальним є підвищення виходу молочної кислоти з відновлюваних джерел, оскільки такі технології вважаються екологічно безпечними. На процес накопичення молочної кислоти впливають численні фактори, серед яких основними є температура, рН, склад поживних речовин та тип субстратів. Найважливішим чинником є температура, оскільки вона безпосередньо визначає активність клітин і швидкість метаболічних процесів, що відбуваються під час біосинтезу молочної кислоти. Не менш важливим є контроль рН середовища, адже його коливання впливають на ріст мікроорганізмів, що, у свою чергу, позначається на продуктивності

синтезу кислоти. Поживні речовини та субстрат також визначають кількість і якість отриманої молочної кислоти [3, 4].

У межах даної роботи досліджували вплив різних концентрацій наносрібла на процес накопичення молочної кислоти. Це дослідження спрямоване на збільшення виходу біосинтезу молочної кислоти шляхом культивування *L. acidophilus* УКМ В – 2691 на модифікованому глюкозо – пептонному середовищі (ГПС) з додаванням різних концентрацій (0,01 мМ – 5 мМ) наносрібла. Отримана молочна кислота може бути використана для синтезу полімолочної кислоти (ПМК), яка застосовується в упаковці, медицині, текстильній промисловості та 3D – друці. Завдяки своїй біорозкладності та екологічній безпечності ПМК має значний потенціал у зменшенні забруднення довкілля шляхом заміщення традиційних пластикових матеріалів [5].

Матеріали та методи

У даному дослідженні використовували штам *Lactobacillus acidophilus* УКМ В – 2691, наданий Інститутом мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України. Наночастки срібла (AgNPs) розміром 18,75 нм взяті для дослідження, були отримані шляхом «зеленого» синтезу в умовах лабораторії кафедри біотехнології шкіри та хутра КНУТД за допомогою культуральної рідини *L. acidophilus* УКМ В – 2691 [6].

Отримання посівного матеріалу.

Отримували посівний матеріал *L. acidophilus* УКМ В – 2691 I та II генерації на MRS – бульйоні протягом 24 годин при температурі $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Паралельно висівали на щільне середовище MRS контролюючи чистоту культури. Після оживлення культури її використовували для накопичення біомаси та метаболітів.

Отримання молочної кислоти.

Біосинтез *L. acidophilus* УКМ В – 2691 проводили на модифікованому глюкозо – пептонному середовищі (ГПС), г/л: дріжджовий екстракт – 20,0; пептон – 20,0; глюкоза – 30,0; MnSO_4 – 0,05; NaCl – 2,0; вода дистильована – до 1000,0 мл. На початку культивування вносили наночастки у концентраціях 0,01 мМ, 0,05 мМ, 0,1 мМ, 0,5 мМ, 1 мМ, 5 мМ. У контрольні зразки нанометали не добавляли.

Культивування здійснювали на качалочній установці Orbitec упродовж 48 год. за температури 37°C , з частотою перемішування 160 об/хв. Після культивування перевіряли оптичну густину дослідного зразка. Після чого відділяли біомасу на центрифугі при швидкості обертання 4000 об/хв. упродовж 30 хв. У надосадовій рідині визначали утворення молочної кислоти.

Визначення кількості біомаси спектрофотометричним методом.

Біомасу за оптичною густиною досліджуваних зразків визначали на УФ – спектрофотометрі ULAB 102UV при довжині хвилі 600 нм. Поживне середовище без внесення культури використовували як контрольний зразок. Оптичну густину вимірювали для відразу засіяних зразків (нульова точка), а також через 48 годин і 96 годин культивування.

Визначення кількості молочної кислоти методом Бюхнера

Цей метод ґрунтується на хімічному перетворенні молочної кислоти в оцтовий альдегід при нагріванні з концентрованою сульфатною кислотою. Внаслідок реакції утворюється червоно – коричневий колір, інтенсивність якого пропорційна концентрації молочної кислоти в зразках.

Для проведення кольорової реакції у пробірки вносять по 1 мл кожного робочого розчину, додають однакову кількість концентрованої сульфатної кислоти, ретельно перемішують і витримують 1,5 хв на водяній бані при температурі $100 \pm 1^\circ\text{C}$. Потім охолоджують пробірки і додають по 0,1 мл свіжоприготовленого розчину гідрохінону. Після перемішування витримують у водяній бані при $100 \pm 1^\circ\text{C}$ ще 15 хв, охолоджують і вимірюють оптичну густину спектрофотометричним методом при довжині хвилі 540 нм.

Для визначення кінцевої концентрації молочної кислоти отримані оптичні густини дослідних зразків порівнюють з калібрувальною кривою.

Для створення калібрувального графіка стандартний розчин молочної кислоти розводять дистильованою водою для отримання робочих розчинів, після чого визначають їх оптичну густину за допомогою спектрофотометра та будують калібрувальну криву, що дозволяє визначити кінцеву концентрацію молочної кислоти.

Статистичний аналіз масиву експериментальних даних.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програмного забезпечення Microsoft Office Excel 2021. Результати, що обраховувались при дослідженні отримання молочної кислоти за допомогою молочнокислих бактерій представлені у вигляді медіани та інтерквартильного розкиду.

Результати та обговорення

Для вивчення впливу AgNPs на синтез молочної кислоти за допомогою *L. acidophilus* УКМ В – 2691 у поживне середовище ГПС вносили наносрібло в різних концентраціях, а саме 0,01 мМ – 5 мМ. Після культивування оцінювали рівень оптичної густини (ОГ) (рис. 1) та обсяг утвореної молочної кислоти (МК) (рис. 2) через 48 і 96 годин.

Проаналізувавши рис. 1, видно, що приріст біомаси за оптичною густиною у контролі на 48 – му та 96 – ту добу становить відповідно 1,33 та 1,42 у.о. При внесенні AgNPs у концентраціях 0,01 та 0,05 мМ у середовище спостерігалось підвищення оптичної густини на 48 – му добу до 1,65 та 1,57 у.о. відповідно. На 96 – ту добу оптична густина при додаванні 0,05 мМ наносрібла дещо зменшувалася до 1,45 у.о., тоді як при концентрації 0,01 мМ залишалася стабільною та вищою за контроль. Отримані результати свідчать, що наночастинки срібла у низьких концентраціях можуть чинити стимулювальний вплив на ріст бактерій, ймовірно, за рахунок активації їхніх метаболічних процесів.

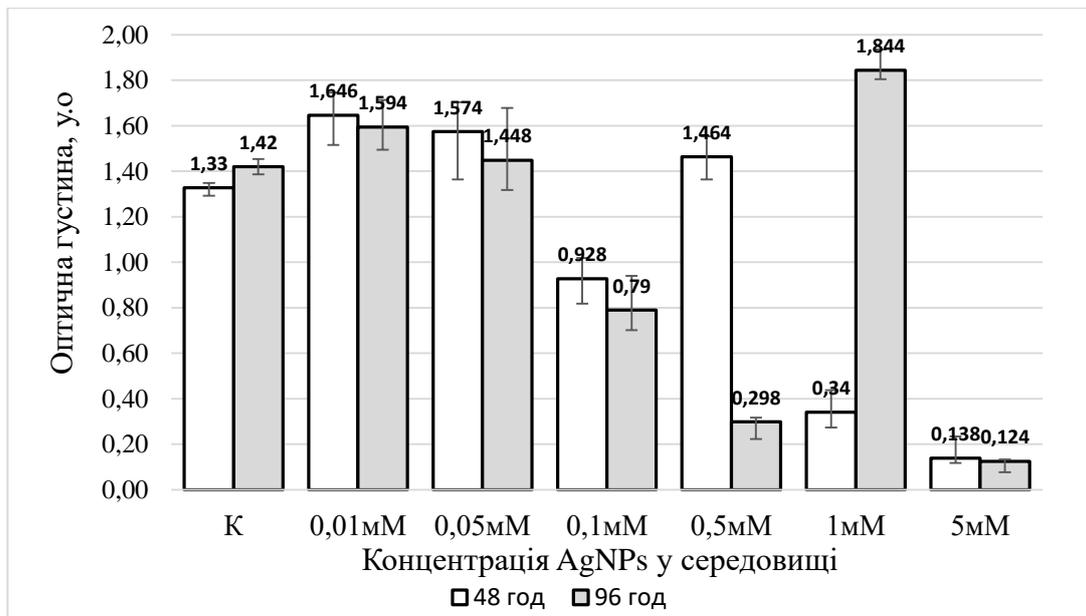


Рис. 1 Дослідження впливу AgNPs на накопичення біомаси *L. acidophilus* УКМ В – 2691 на 48 та 96 годину культивування: К – контроль, без внесення наночасток, 0,01мМ, 0,05мМ, 1,0мМ, 0,5мМ, 1мМ, 5мМ – концентрації наносрібла, що вносили у поживне середовище ГПС.

При збільшенні концентрації AgNPs у середовищі до 0,1 мМ рівень накопичення біомаси за оптичною густиною зменшується майже удвічі порівняно з контролем і становить 0,93 та 0,79 у.о. на 48 – му та 96 – ту годину відповідно.

Цікаву динаміку спостерігали при внесенні AgNPs у концентраціях 0,5 та 1 мМ. Протягом перших двох діб наносрібло практично не впливало на накопичення біомаси – оптична густина залишалася на рівні контролю (1,46 у.о.). Однак на 96 – ту годину відзначалося зниження ОГ до 0,298 у.о., що може свідчити про короткочасну адаптацію клітин до стресового чинника з подальшим виснаженням популяції внаслідок накопичення токсичного ефекту.

При внесенні AgNPs у концентрації 1 мМ спостерігалася протилежна тенденція: на початку культивування ця концентрація виявляла токсичну дію, проте після 48 год бактерії адаптувалися та відновили активне розмноження, про що свідчить зростання ОГ до 1,844 у.о., що перевищує контроль. Така реакція може свідчити про стрес – індуковану активацію метаболічних процесів.

Концентрація 5 мМ виявилася токсичною для бактерій *Lactobacillus acidophilus* УКМ В – 2691, про що свідчать показники оптичної густини, наведені на рис. 1. Значення ОГ становили 0,138 та 0,124 у.о. на 48 – му та 96 – ту годину культивування відповідно.

Проаналізувавши рис. 2, видно, що рівень молочної кислоти у контрольному зразку становив 20 г/л на 48 – му добу культивування та 13 г/л – на 96 – ту добу. Зниження концентрації молочної кислоти може свідчити про те, що клітини починають використовувати її як субстрат для

утворення інших метаболітів, зокрема бактеріоцинів, екзополісахаридів тощо.

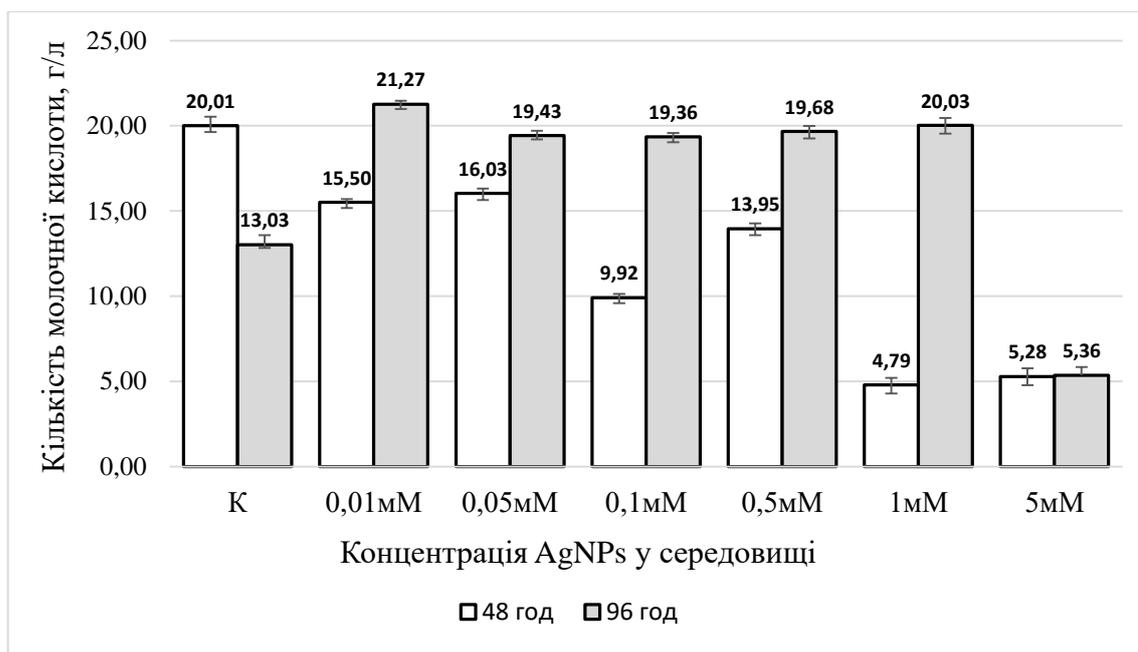


Рис. 2 Дослідження впливу AgNPs на накопичення молочної кислоти бактеріями *L. acidophilus* УКМ В – 2691 на 48 та 96 годину культивування:
К – контроль, без внесення наночастинок, 0,01мМ, 0,05мМ, 1,0мМ, 0,5мМ, 1мМ, 5мМ – концентрації наносрібла, що вносили у поживне середовище ГПС.

При додаванні AgNPs у концентраціях 0,01 та 0,05 мМ накопичення молочної кислоти на 48 – му годину становило 15,5 та 16,1 г/л відповідно, що нижче за контроль. Проте на 96 – ту годину кількість молочної кислоти зростала до рівня контрольного показника – 21,3 та 19,4 г/л відповідно. Це може свідчити, що наночастинки срібла у низьких концентраціях проявляють стимулювальний вплив, активуючи метаболічні процеси бактерій. Подібну тенденцію спостерігали й за внесення AgNPs у концентраціях 0,1, 0,5 та 1 мМ: на 48 – му годину рівень накопичення молочної кислоти був нижчим, зокрема 9,9 г/л; 13,4 г/л; 4,79 г/л відповідно, однак на 96 – ту годину він зростав до 19,3; 19,7 та 20 г/л відповідно.

Концентрація AgNPs 5 мМ виявилася токсичною не лише для росту бактерій *Lactobacillus acidophilus* УКМ В – 2691, але й для їхньої здатності синтезувати молочну кислоту, про що свідчать низькі показники її накопичення – 5,28 та 5,26 г/л на 48 – му та 96 – ту добу культивування відповідно.

Висновки. Отже, проаналізувавши вплив наночастинок срібла (AgNPs) на утворення біомаси та синтез молочної кислоти, можна зробити висновок, що у низьких концентраціях (0,01 та 0,05 мМ) наносрібло проявляє стимулювальний ефект на накопичення біомаси – оптична

густина становила 1,65 та 1,57 у.о. на 48 – му годину та 1,6 і 1,45 у.о. на 96 – ту годину культивування.

Концентрації 0,1 мМ та 5 мМ, навпаки, знижували рівень біомаси, проявляючи токсичну дію: на 48 – му та 96 – ту години ОГ становила відповідно 0,93 і 0,79 у.о. (при 0,1 мМ) та 0,14 і 0,13 у.о. (при 5 мМ). Концентрація 0,5 мМ протягом перших 48 год не впливала на ріст (1,46 у.о.), однак на 96 – ту годину оптична густина зменшувалася до 0,298 у.о. При концентрації 1 мМ спостерігали зворотну тенденцію – на 48 – му годину рівень біомаси був нижчим (0,34 у.о.), проте на 96 – ту годину зростав до 1,844 у.о.

Вплив AgNPs на утворення молочної кислоти у *Lactobacillus acidophilus* УКМ В – 2691 мав дещо інший характер. У контрольному зразку максимальне накопичення спостерігали на 48 – му годину культивування (20 г/л), після чого рівень знижувався до 13 г/л на 96 – ту годину. За внесення наносрібла у концентраціях від 0,01 до 1 мМ на 48 – му годину спостерігали нижчі показники накопичення молочної кислоти (5 – 16 г/л), проте на 96 – ту годину вони зростали до 19,4 – 21,3 г/л. Концентрація 5 мМ виявилася токсичною як для росту клітин *L. acidophilus* УКМ В – 2691, так і для синтезу ними молочної кислоти – показники становили 0,14 у.о. та 5,3 г/л на 48 – му годину і 0,13 у.о. та 5,4 г/л на 96 – ту годину культивування.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Development of a strategy for l – lactic acid production by rhizopus oryzae using zizania latifolia waste and cane molasses as carbon sources/ F. – W. Yin et al. *Molecules*. 2023. Vol. 28, no. 17. P. 6234. URL: <https://doi.org/10.3390/molecules28176234>
2. Anumudu C. K., Miri T., Onyeaka H. Multifunctional applications of lactic acid bacteria: enhancing safety, quality, and nutritional value in foods and fermented beverages. *Foods*. 2024. Vol. 13, no. 23. P. 3714. URL: <https://doi.org/10.3390/foods13233714>
3. Abdel – Rahman M. A., Tashiro Y., Sonomoto K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology advances*. 2013. Vol. 31, no. 6. P. 877–902. URL: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.002>
4. Effect of pH on lactic acid production from acidogenic fermentation of food waste with different types of inocula/ J. Tang et al. *Bioresource technology*. 2017. Vol. 224. P. 544–552. URL: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.111>
5. Abedi E., Hashemi S. M. B. Lactic acid production – producing microorganisms and substrates sources – state of art. *Heliyon*. 2020. Vol. 6, no. 10. P. e04974. URL: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04974>
6. Voloshyna I., Fedko M., Lastovetska L., Shkotova L. Green biosynthesis of AgNPs by *Lactobacillus acidophilus* and their use. In book: ICAMS 2024 – 10th International Conference on Advanced Materials and Systems (30 – 31 October 2024, Bucharest, Romania): CERTEX press, 2024. P. 283 – 288.

1.18 БІОСИНТЕЗ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЦЕЛЮЛОЗИ НА СЕРЕДОВИЩІ З ЛЬОНОМ

Косинська Т. В.¹, Потупа В. Ю.¹, Федько М. М.^{1,2},
Жеревчук С. М.¹, Волошина І. М.¹

¹Київський національний університет технологій та дизайну, Україна

²ТОВ «Фармхім», Україна
wirn@ukr.net

Досліджено вплив білкового концентрату льону різних концентрацій (0,1%, 0,2% та 0,3%) на формування та ріст бактеріальної біоплівки за допомогою мікробної асоціації *SCOBY*. Встановлено, що найвищий вихід БЦ (144 г/л на 7 – му добу) отримано на середовищі, що містило глюкозу (80 г/л) і 0,1% білкового концентрату льону. Збільшення концентрації білкового концентрату льону до 0,2 – 0,3% призводило до зниження утворення біоплівок.

Ключові слова: бактеріальна целюлоза, *SCOBY*, біоплівки, біосинтез, білковий концентрат льону.

Бактеріальна целюлоза (БЦ) – це унікальний відновлюваний природний матеріал із тривимірною структурою, що надає йому відмінних механічних властивостей та високої здатності утримувати вологу. Вона є кристалічним, чистим і біосумісним полімером, який має таку саму хімічну формулу, як і рослинна целюлоза – $(C_6H_{10}O_5)_n$, утворену з β – D – глюкопіранозних ланок, з'єднаних міжмолекулярними водневими зв'язками. Однак, на відміну від рослинної целюлози, бактеріальна характеризується ультратонкою сітчастою структурою з високою пористістю та нанорозмірними фібрилами, що забезпечує їй низку переваг. Вона не містить домішок, таких як лігнін, геміцелюлоза чи пектин, завдяки чому процес її очищення значно простіший [1].

На сьогодні відомо, що продуцентами БЦ є представники різних родів грамнегативних бактерій, таких як *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Azotobacter*, *Rhizobium* та *Komagataeibacter xylinus* (раніше відомий як *Acetobacter* і *Gluconacetobacter*), а також деякі грампозитивні бактерії – *Sarcina ventriculi*, *Lactobacillus sp.*, *Bacillus sp.* і *Rhodococcus sp* [2].

Мікробна асоціація (*SCOBY*) – це симбіотична культура, відома також як чайний гриб або комбуча, яка складається з близько десяти родів оцтовокислих бактерій, що утворюють целюлозну гелеву плівку, та приблизно двадцяти п'яти родів дріжджів, які забезпечують сприятливі умови для спільного існування мікроорганізмів – продуцентів БЦ.

Останніми роками зростає науковий інтерес до використання симбіотичних культур типу *SCOBY*, оскільки з технологічної точки зору вони дають змогу здійснювати культивування навіть у нестерильних умовах, що знижує виробничі витрати.

У процесі бродіння чайного гриба на поверхні поживного середовища формується шар целюлозної плівки, який плаває на межі поділу повітря й рідини. Завдяки симбіотичній взаємодії бактерій та дріжджів спостерігається підвищення ефективності синтезу БЦ, що робить цю систему перспективною для біотехнологічних застосувань [3].

Основними факторами, що впливають на синтез БЦ, є склад живильного середовища, температура, рівень рН та наявність кисню. Оптимальний рівень рН для більшості продуцентів становить 4 – 5, що сприяє активності оцтовокислих бактерій і знижує ризик контамінації.

Найефективніше утворення біоплівки відбувається за температури 28 – 30°C (іноді до 33,5 °C), оскільки відхилення від цього діапазону знижує продуктивність. Для аеробних продуцентів важливим є достатнє надходження кисню, адже його дефіцит сповільнює ріст клітин і синтез целюлози [1, 4, 5].

Вибір субстрату є ключовим фактором успішного синтезу бактеріальної целюлози. Основними компонентами поживного середовища є джерела вуглецю та азоту, що забезпечують ріст і метаболізм мікроорганізмів. Джерелами нітрогену можуть бути пептон, гліцин, дріжджовий екстракт, глутамат натрію, гідролізований казеїн, сульфат амонію тощо, а джерелами карбону – цукри (глюкоза, сахароза, лактоза, фруктоза, мальтодекстрин).

Додатковими субстратами виступають неорганічні солі (Na_2HPO_4 , солі магнію, калію, сірки), органічні кислоти (оцтова, лимонна, молочна), вітаміни та жирні кислоти. Важливим параметром є співвідношення C/N, адже його порушення знижує вихід целюлози. Найкращі результати спостерігаються при використанні дріжджового екстракту, тоді як неорганічні джерела нітрогену дають нижчий вихід [6, 7].

Найпоширенішим середовищем для синтезу є середовище Хестрин – Шрамма (HS), однак через високу вартість його компонентів тривають пошуки дешевших альтернатив. Перспективним напрямом є використання аграрних і промислових відходів харчових виробництв, які містять необхідні поживні речовини та забезпечують вихід БЦ, порівнянний зі стандартними середовищами [8].

Дослідження було спрямоване на отриманні БЦ за допомогою відходів сільського господарства. У межах роботи було досліджено вплив різних концентрацій білків льону на формування та ріст біоплівки за допомогою мікробної асоціації SCOBY. Отримували БЦ використовуючи середовище на основі чорного чаю та різних концентрацій білкового концентрату льону (0,1%, 0,2% та 0,3%).

Отримана БЦ може використовуватися у різних сферах завдяки своїй високій чистоті, біосумісності та сприятливим механічним, морфологічним і структурним властивостям. У медицині її застосовують для лікування ран у вигляді пов'язок або пластирів, а також досліджують для потенційного використання в імплантатах та тканинних штучних конструкціях. У косметології БЦ використовують для виготовлення гідрогелевих масок,

патчів та як компонент кремів і інших косметичних засобів. У харчовій промисловості її застосовують як харчову добавку та для виробництва біорозкладної упаковки. Крім того, завдяки своїм фізико – хімічним властивостям БЦ може використовуватися в текстильній промисловості для створення матеріалів із покращеними механічними характеристиками. Незважаючи на широкий спектр застосувань, найбільшу увагу приділяють біомедицині через високу біосумісність цього матеріалу [9].

Методи та матеріали

Характеристика мікробної асоціації SCOBY

Симбіотична спільнота бактерій і дріжджів SCOBY є складною мікробною системою, у якій взаємодіють різні групи мікроорганізмів. Основу становлять оцтовокислі бактерії (ААВ) – *Komagataeibacter xylinus*, *K. kombuchae*, *Acetobacter aceti*, *A. pasteurianus*, *Gluconobacter oxydans* та інші, що беруть участь у синтезі целюлози й органічних кислот. До складу також входять осмофільні дріжджі (*Brettanomyces bruxellensis*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora valbyensis* тощо), які забезпечують спиртове бродіння та утворення вуглекислого газу. Крім того, у спільноті присутні молочнокислі бактерії (LAB), зокрема *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *Leuconostoc spp.*, *Pediococcus spp.*, що сприяють накопиченню органічних кислот і покращенню пробіотичних властивостей напою. Таким чином, завдяки взаємодії трьох основних груп мікроорганізмів (ААВ, дріжджів і LAB) та динамічним змінам їхнього складу, чайний гриб (SCOBY) можна розглядати як природний резервуар потенційно пробіотичних штамів.

Отримання посівного матеріалу

Для культивування мікробної асоціації SCOBY найчастіше застосовують середовище HS (Hestrin & Schramm), до складу якого входять (г/л): глюкоза – 20, пептон – 5, дріжджовий екстракт – 5, динатрій фосфат – 2,7, лимонна кислота моногідрат – 1,5, вода – до 1 л. Компоненти розчиняють у воді, суміш стерилізують при 121°C протягом 20 хв, після чого охолоджують перед використанням.

Як посівний матеріал застосовували накопичувальну культуру SCOBY. До середовища HS додавали 10% інокуляту, культивували при 30°C протягом 48 год. За цей час утворювалась біоплівка на межі рідина–повітря. Після культивування плівку видаляли, а осаджені клітини переносили в свіже середовище HS для подальшого росту.

Біосинтез бактеріальної целюлози

Для синтезу БЦ з використанням SCOBY застосовували середовище на основі чорного чаю (5 г/л) із додаванням: сахарози – 20 та 40 г/л, глюкози – 40 та 80 г/л та їх суміші (табл. 1), білкового концентрату льону – 0,1, 0,2 та 0,3%, дріжджового автолізу – 5%. Рівень рН доводили до 4 оцтовою кислотою. Для оцінки ефективності варіювали співвідношення вуглеводів і білкових компонентів, тоді як концентрації чорного чаю та дріжджового автолізу залишалися незмінними.

Готували 1% розчин концентрату льону, який кип'ятили 30 хв, фільтрували та центрифугували при 4000 об/хв протягом 10 хв. Для приготування середовища брали необхідний відсоток очищеного розчину.

Дріжджовий автолізат отримували з пресованих дріжджів (50%) шляхом кип'ятіння 40 хв, після чого використовували потрібну концентрацію.

У стерильних умовах у колби з 150 мл поживного середовища (рН 4) додавали 10% посівного матеріалу. Культивування проводили статично при 30°C упродовж 7 діб. Сформовані бактеріальні плівки знімали для подальших досліджень, а середовище використовували повторно після контролю рН.

Визначення рН середовища

Рівень кислотності визначали за допомогою лакмусового паперу або рН – метра. Оптимальний рН для розвитку SCOBY становить 3–5. Корекцію проводили оцтовою кислотою або гідроксидом натрію.

Очищення біоплівки

Очищення здійснювали за допомогою 5% NaOH, гіпохлориду натрію. Плівки кип'ятили в розчині NaOH 10 хв, після чого промивали до нейтрального значення рН (6–7) дистильованою водою.

Визначення ваги біоплівки

Масу плівок визначали ваговим методом у два етапи, спочатку проводили зважування сирих плівок після видалення вологи, а потім повторно зважували плівки після очищення.

Статистичний аналіз

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програмного забезпечення Microsoft Office Excel 2021.

Результати та обговорення

Досліджували вплив різного складу поживних середовищ (табл. 1) для збільшення виходу БЦ. Як видно з табл. 1 використовували концентрації сахарози (20 г/л та 40 г/л) і глюкози (40 г/л та 80 г/л) та білковий концентрат льону (0,1%, 0,2%, 0,3%).

Результати показали, що білковий концентрат льону (БКЛ) є ефективним компонентом середовища, оскільки накопичення бактеріальної целюлози (БЦ) збільшується. Найвищу масу біоплівки на 7 – му добу культивування отримано в середовищах № 4, 5, 7, 8, 10 – відповідно 144, 126, 138,6, 98,6 та 111,3 г/л. Однак у варіантах № 4, 5, 8 на 14 – ту добу маса біоплівки була в межах 35 – 62 г/л, тоді як на середовищах в які додавали суміш сахарози/глюкози та 0,1% БКЛ, а саме № 7 (20/40 г/л) та №10 (40/80 г/л) приріст БЦ залишався майже однаковим на 7 – му і 14 – ту добу. У середовищі № 7 маса біоплівки становила 138,6 та 87,3 г/л на 7 – му і 14 – ту добу. При вирощуванні на середовищі № 10 маса біоплівки була 111,3 г/л на 7 – му і 114,6 г/л на 14 – ту добу. Тобто на середовищах № 7 та № 10 за період до 14 діб було зібрано дві повноцінні біоплівки без додаткового внесення поживних речовин.

Таблиця 1. Утворення біоплівки на середовищі з білковим концентратом льону

| № середовища | Джерело цукру, г/л | | БКЛ, % | Вага відмитих плівок | |
|--------------|--------------------|---------|--------|----------------------|--------------|
| | Сахароза | Глюкоза | | на 7 добу | на 14 добу |
| 1 | 40 | – | 0,1 | 77,3 (±3,8) | 44,6 (±2,2) |
| 2 | 40 | – | 0,2 | 58 (±2,9) | 42,6 (±2,1) |
| 3 | 40 | – | 0,3 | 44,6 (±2,2) | 20,6 (±1) |
| 4 | – | 80 | 0,1 | 144 (±7,2) | 38 (±1,9) |
| 5 | – | 80 | 0,2 | 126 (±6,3) | 35,3 (±1,7) |
| 6 | – | 80 | 0,3 | 55,3 (±2,7) | 8,6 (±0,4) |
| 7 | 20 | 40 | 0,1 | 138,6 (±6,9) | 87,3 (±4,3) |
| 8 | 20 | 40 | 0,2 | 98,6 (±4,9) | 62 (±3,1) |
| 9 | 20 | 40 | 0,3 | 80,6 (±4) | 60,6 (±3) |
| 10 | 40 | 80 | 0,1 | 111,3 (±5,5) | 114,6 (±5,7) |
| 11 | 40 | 80 | 0,2 | 89,3 (±4,4) | 89,3 (±4,4) |
| 12 | 40 | 80 | 0,3 | 73,3 (±3,6) | 58 (±2,9) |

Примітка: БКЛ – білковий концентрат льону; у якості додаткових компонентів використовували чорний чай, дріжджовий автолізат, плівки на 14 добу були новоутворені після перших знятих біоплівки, початковий рН – 3.

На рис. 1 показано вплив різних концентрацій білкового концентрату льону (0,1%, 0,2% і 0,3%) при вирощуванні мікробної асоціації на середовищах з різним вмістом цукрів.

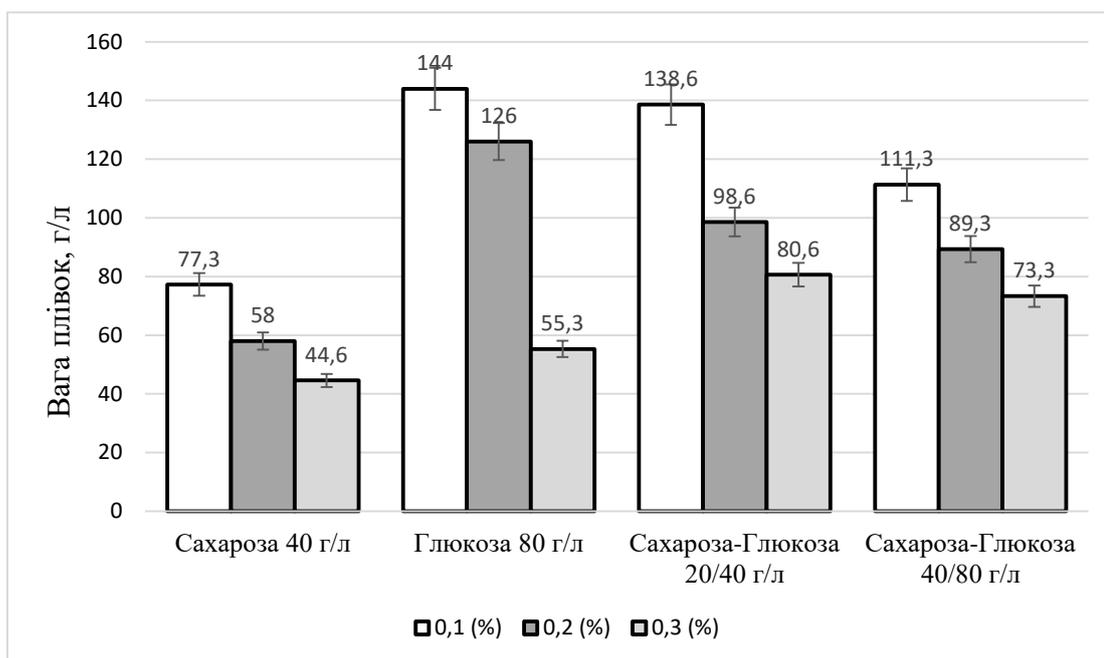


Рис. 1 Маса біоплівки синтезованих на середовищі з сахарозою та глюкозою (40 та 80 г/л) та їх комбінацією (20/40 та 40/80 г/л) з білковим концентратом льону в концентрації (0,1%, 0,2% та 0,3 %) на 7 – му добу

В усіх комбінаціях поживного середовища спостерігали, що збільшення внесення БКЛ до 0,3% знижувався вихід маси біоплівки. Найнижчі результати спостерігали на середовищах з сахарозою 40 г/л та 0,1%, 0,2% та 0,3% БКЛ (77,3 г/л, 58 г/л та 44,6 г/л), тоді як найвищий вихід маси БЦ спостерігали на середовищі з 80 г/л глюкози та внесенні

БКЛ 0,1% (144 г/л) та 0,2% (126 г/л). Також слід зазначити, що комбінування цукрів сахароза/глюкоза призводило до збільшення накопичення маси бактеріальної целюлози. Високий вихід БЦ (138,6 г/л) спостерігали на середовищі з сахароза/глюкоза 20/40 г/л з 0,1% БКЛ, однак, при збільшенні внесення БКЛ до 0,2% та 0,3% маса біоплівки була 98,6 та 80,6 г/л відповідно (рис.1).

На рис. 2 представленні фото не очищених біоплівки з найвищою масою на 7 – му добу на середовищах 4, 5, 7 та 10. Синтезовані біоплівки мали щільну структуру та нерівну поверхню. Темне забарвлення зумовлене використанням чорного чаю як додаткового субстрату, що спричинив пігментацію. Коричневі плями утворювались через наявність у середовищі білкових концентратів, які стимулювали синтез сполук, що осідали на плівках у вигляді згустків. Під час очищення ці домішки змивалися, внаслідок чого зменшувалася маса плівок.

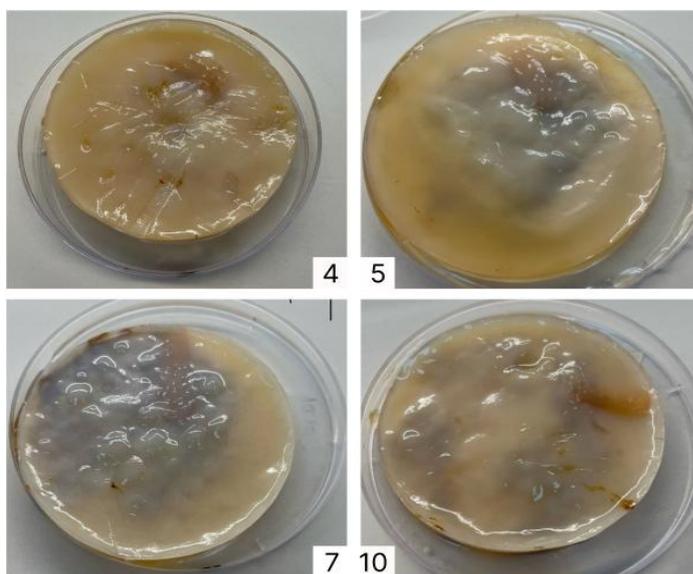


Рис. 2. Фотографії біоплівки не відмитих на 7 – му добу культивування на середовищах: з глюкозою (80 г/л) та БКЛ у концентрації 0,1% (4), 0,2% (5); з сумішшю сахароза/глюкоза (20/40 г/л) та БКЛ у концентрації 0,1% (7); з сумішшю сахароза/глюкоза (40/80 г/л) та БКЛ у концентрації 0,1% (10)

Висновки. У ході дослідження було показано, що з додатковим внесенням білкового концентрату льону збільшувався вихід синтезу бактеріальної целюлози (БЦ) із використанням мікробної асоціації SCOVY. Найвищі показники синтезу спостерігались при концентрації глюкози 80 г/л і БКЛ 0,1%, оскільки маса плівок досягала 144 г/л на 7 – му добу, однак на 14 – ту добу накопичувалося БЦ лише 38 г/л. Подальше збільшення концентрації білкового компонента (0,2 – 0,3%) призводило до зниження утворення біоплівки, що свідчить про необхідність оптимізації вмісту нітрогену в середовищі. У середовищах з комбінованим внесенням 0,1% БКЛ та сахарози/глюкози 20/40 г/л (№7) і 40/80 г/л (№10) маса плівок була майже однаковою на 7 – му та 14 – ту добу культивування. У середовищі № 7 маса біоплівки становила 138,6 та 87,3 г/л на 7 – му і 14 –

ту добу. з комбінацією (40/80 г/л) та БКЛ 0,1% маса плівок становила 111,3 г/л (7 – ма доба) та 114,6 г/л (14 доба) відповідно. Отримані плівки мали щільну, бугристу структуру та темне забарвлення, зумовлене використанням чорного чаю і білкових добавок.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. *Hodel K. V. S. et al.* Evaluation of Different Methods for Cultivating *Gluconacetobacter hansenii* for Bacterial Cellulose and Montmorillonite Biocomposite Production: Wound – Dressing Applications. *Polymers*. 2020. Vol. 12, no. 2. P. 267. URL: <https://doi.org/10.3390/polym12020267>
2. *Saleh A. K. et al.* Bioprocess development for bacterial cellulose biosynthesis by novel *Lactiplantibacillus plantarum* isolate along with characterization and antimicrobial assessment of fabricated membrane. *Scientific Reports*. 2022. Vol. 12, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06117-7>
3. *Ayed L., Ben Abid S., Hamdi M.* Development of a beverage from red grape juice fermented with the Kombucha consortium. *Annals of Microbiology*. 2016. Vol. 67, no. 1. P. 111–121. URL: <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1242-2>
4. *Lahiri D. et al.* Bacterial Cellulose: Production, Characterization, and Application as Antimicrobial Agent. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22, no. 23. P. 12984. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms222312984>
5. *Hwang J. W. et al.* Effects of pH and dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 in agitated culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 1999. Vol. 88, no. 2. P. 183–188. URL: [https://doi.org/10.1016/s1389-1723\(99\)80199-6](https://doi.org/10.1016/s1389-1723(99)80199-6)
6. *Fernandes I. d. A. A. et al.* Bacterial cellulose: From production optimization to new applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020. Vol. 164. P. 2598–2611. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.255>
7. *Rahman S. S. A. et al.* Production of bacterial cellulose using *Gluconacetobacter kombuchae* immobilized on *Luffa aegyptiaca* support. *Scientific Reports*. 2021. Vol. 11, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82596-4>
8. *A. Kadier et al.* Use of Industrial Wastes as Sustainable Nutrient Sources for Bacterial Cellulose (BC) Production: Mechanism, Advances, and Future Perspectives. *Polymers*. 2021. Vol. 13, no. 19. P. 3365. URL: <https://doi.org/10.3390/polym13193365>
9. *Zhong C.* Industrial – Scale Production and Applications of Bacterial Cellulose. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020. Vol. 8. URL: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.605374>

1.19 ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРИ ТА pH НА БІОСИНТЕЗ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДІВ *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS*

Юркевич А. І.¹, Майстренко Л. А.¹, Шкотова Л. В.², Волошина І. М.¹

¹Київський національний університет технологій та дизайну, Україна,

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Україна

wirn@ukr.net

*Досліджено вплив фізичних стресових факторів, а саме pH та температури, на біосинтез екзополісахаридів (ЕПС) молочнокислими бактеріями *Lactobacillus acidophilus* УКМ В – 2691. Встановлено, що оптимальні умови для максимального утворення ЕПС – це температура 30°C та кисле середовище (pH ≈ 3). Значні відхилення від цих параметрів призводять до зниження продуктивності, що пояснюється впливом на активність ферментів, проникність мембрани та метаболічний стан клітин.*

Ключові слова: екзополісахариди, *Lactobacillus acidophilus*, біосинтез, pH, температура, стресові фактори.

Екзополісахариди це високомолекулярні вуглеводи які утворюються мікроорганізмами як побічний продукт для захисту клітин [1]. Вони відіграють важливу роль для клітин створюючи захисні механізми, біоплівки та адгезії поверхонь. ЕПС мають потенціал застосування у харчовій промисловості, медицині та нафтовидобувній промисловості [1]. Виробництво ЕПС часто пов'язане з високими витратами, тому зараз наукове суспільство робить фокус на біосинтезі екзополісахаридів за допомогою безпечних мікроорганізмів здатних синтезувати ці полімери. Біосинтез ЕПС залежить від численних факторів, серед яких важливе місце займають фізичні параметри середовища, такі як pH та температура [2, 3].

Синтез екзополісахаридів може бути спричинений проявом певних стресових факторів для клітини. Серед варіації таких стресових умов можуть бути зміна pH та температура культурального середовища. Ці показники впливають не тільки на ріст а й на кількість синтезованого ЕПС.

pH культурального середовища є одним з найважливіших абіотичних стресових факторів, що впливає як на ріст лактобактерій, так і на виробництво ними ЕПС. Зазвичай проводять експерименти, в яких початкове значення pH середовища MRS (або іншого) регулюється до різних рівнів за допомогою розчинів NaOH або HCl. Після активації лактобактерій їх інокують у середовище з встановленим pH і культивують протягом певного часу, після чого визначають концентрацію накопичених ЕПС. Результати досліджень показують, що оптимальний pH для формування ЕПС залежить від конкретного штаму LAB та експериментальних умов. Однак, існує загальна тенденція до того, що найбільш сприятливим для максимального виробництва ЕПС є pH, близький до 6,0 [4].

Метою даної роботи було дослідити як впливають стресові фізичні фактори, на *Lactobacillus acidophilus* УКМ В – 2691 для біосинтезу

екзополісахаридів на модифікованому глюкозо – пептонному середовищі (ГПС).

Методи та матеріали

Використовували штам *Lactobacillus acidophilus* УКМ В – 2691, який депоновано в Інституті мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України.

Отримання посівного матеріалу

Отримували посівний матеріал *L. acidophilus* УКМ В – 2691 I та II генерації на MRS – бульйоні протягом 24 год при температурі 37°C. Висівали на середовище агар – MRS. Після чого використовували в подальшому для накопичення біомаси та метаболітів.

Отримання екзополісахаридів

Біосинтез *L. acidophilus* УКМ В – 2691 проводили на модифікованому глюкозо – пептонному середовищі (ГПС), г/л: дріжджовий екстракт – 20,0; пептон – 20,0; глюкоза – 30,0; MnSO₄ – 0,05; NaCl – 2,0; вода дистильована – до 1000,0 мл, після чого створювали стресові фактори, а саме зміна температури та рН.

Зміна температури культивування

Культуру *L. acidophilus* УКМ В – 2691 вирощували 48 год при 37 °С, 160 об/хв, після чого перенесли на інші температурні режими: 20 °С, 25 °С, 30 °С, 37 °С, 42 °С без перемішування і інкубували до 96 год.

Зміна рН культивування

Дослідження проводили двома способами. У першому змінювали рН поживного середовища на початку культивування до показників 3, 7 та 9 та інкубували 96 год при 37 °С, 160 об/хв. В іншому випадку культивували *L. acidophilus* УКМ В – 2691 в оптимальних умовах 48 год, після чого змінювали рівень рН до 3, 7 та 9 і продовжували інкубацію до 96 год. Для регулювання рН використовували H₂SO₄ та NaOH. Культивування здійснювали на качалочній установці Orbitec упродовж 96 год. за температури 37°C з частотою перемішування 160 об/хв, та за допомогою термостатів з різними температурними режимами.

Визначення кількості біомаси спектрофотометричним методом

Біомасу досліджуваних зразків визначали за оптичною густиною на УФ – спектрофотометрі ULAB 102UV при довжині хвилі 600 нм. Чисте поживне середовище ГПС використовували як контрольний зразок. Оптичну густина вимірювали для відразу засіяних зразків, а також через 48 годин і 96 годин культивування.

Визначення кількості екзополісахариду методом екстрагування спирту

Відділяли біомасу у дослідних зразках ЕПС виділяли у зразках на 48 та на 96 годину культивування. Спочатку відділяли біомасу і до над осадової рідини додавали 3 – кратний об'єм спирту, після чого залишали за температури 2 – 8 °С на 24 год. Після відділяли ЕПС на центрифугі при швидкості обертання 4000 об/хв. упродовж 10 хв. Зливали надосад, зразки

з екзополісахаридом висушували за температури 30С упродовж 24 год та визначали рівень ЕПС ваговим методом.

Статистичний аналіз масиву експериментальних даних

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою Microsoft Office Excel 2021. Результати, що обраховувались при дослідженні отримання екзополісахариду за допомогою молочнокислих бактерій представлені у вигляді графіку.

Результати та обговорення

Для вивчення впливу фізичних стресових факторів, на синтез екзополісахаридів за допомогою *L. acidophilus* УКМ В – 2691 змінювали такі параметри, як кислотність середовища та температуру культивування.

Вплив температури. Вирощували культуру молочнокислих бактерій *L. acidophilus* УКМ В – 2691 на середовищі ГПС. У процесі культивування змінювали температуру, як один із стресових факторів, для збільшення накопичення ЕПС. Для того, щоб побачити вплив температури на накопичення метаболітів накопичували біомасу упродовж 48 год за оптимальної температури 37°С для розвитку та росту бактерій та перемішування 160 об/хв. Після чого змінювали температуру у діапазоні 20 – 42°С та вимикали повністю перемішування. На першому етапі перевіряли, як впливає зміна температури на накопичення біомаси після 48 год культивування. Результати дослідження впливу температури на біомасу представлені на рис. 1.

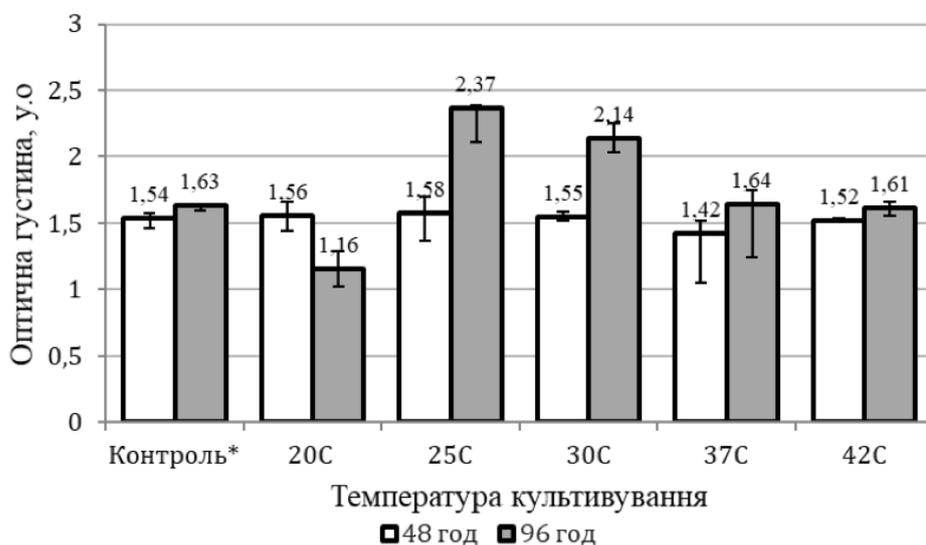


Рис. 1 Вплив температури на накопичення біомаси *L. acidophilus* УКМ В – 2691 за оптичною густиною (D 600 нм). Усі варіанти 48 год вирощували за 37°С, 160 об/хв. Потім вимикали перемішування і змінювали температуру: контроль, вирощували за t 37°С, 160 об/хв., інші зразки за t 20°С, 25°С, 30°С, 37°С, 42°С і вирощували до 96 год.

Аналізуючи результати діаграми видно, що приріст біомаси за оптичною густиною на 48 год культивування *L. acidophilus* УКМ В – 2691 становив 1,16 – 1,58, а вже наступні 48 год, коли змінювали температуру і вимикали перемішування спостерігали збільшення рівня біомаси за температури 25°С, 30°С та 37°С. Тоді як температура 20°С та 42°С майже

не змінювала результати. Оскільки ми перевіряли рівень накопичення біомаси непрямим методом за допомогою спектрофотометра можемо зробити висновок, що збільшилась мутність культуральної рідини в якій знаходилась біомаса та її метаболіти. Отже, у подальшому визначали накопичення екзополісахаридів у культуральній рідині. Вміст екзополісахаридів перевіряли осадженням спиртом з подальшим зважуванням та висушуванням осаду (рис. 2).

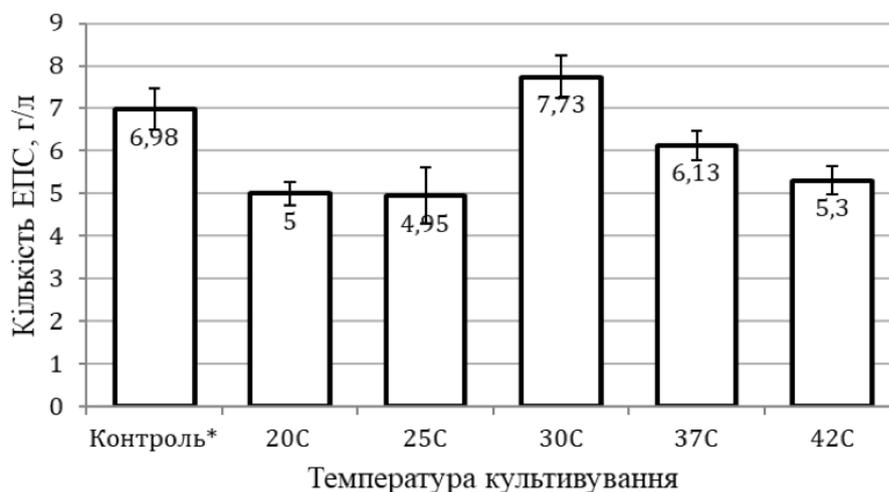


Рис. 2. Вплив температури на накопичення ЕПС *L. acidophilus* УКМ В – 2691. Усі варіанти 48 год вирощували за 37°C, 160 об/хв. Потім вимикали перемішування і змінювали температуру: контроль, вирощували за t 37°C, 160 об/хв., інші зразки за t 20°C, 25°C, 30°C, 37°C, 42°C і вирощували до 96 год

Як видно із рис. 2 для отримання екзополісахаридів найкраще використовувати температуру 30°C. Якщо проаналізувати результати впливу температури накопичення ЕПС, як стресового фактору після накопичення біомаси то бачимо, що за температури 20 – 25°C та 42°C рівень ЕПС становить 4,95 – 5,3 г/л відповідно, тоді як за температури 37°C – 6,13 г/л і найбільше значення 7,73 за температури 30°C. Це може свідчити про те, що клітини знаходячись в температурних умовах відчувають стрес і починають синтезувати ЕПС. Тоді як вплив доступу повітря не впливає на накопичення метаболітів, оскільки досліджувані бактерії є аеротолерантними.

Вплив рівня рН середовища

Під час культивування змінювали рН, щоб відслідкувати вплив на накопичення екзополісахаридів. Культивували штамп за оптимальних умов, а саме температури 37°C впродовж 48 год використовуючи перемішування 160 об/хв для накопичення біомаси. Після чого змінювали кислотно – лужний баланс у діапазоні 3 – 9 рН та вимикали перемішування. Під час першого етапу дослідження перевіряли, як впливає зміна рН на накопичення рівня біомаси за оптичною густиною після 48 год культивування. Результати досліджу впливу температури на біомасу представлені на рис. 3.

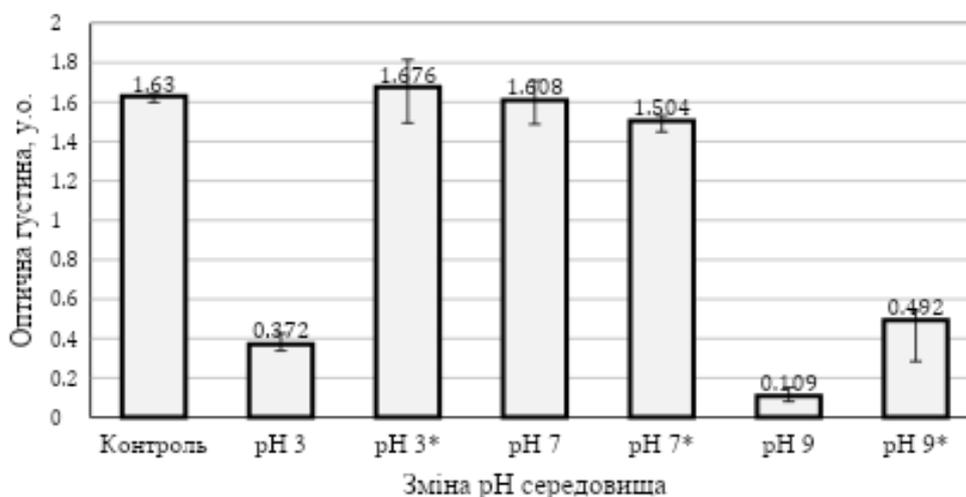


Рис. 3. Вплив рН на біомасу *L. acidophilus* УКМ В – 2691 за оптичною густиною (D 600 нм): Контроль – вирощували за початкового рН 6, t 37°C, 160 об/хв, 96 год, рН 3, 7, 9 – змінювали значення рН на початку культивування, рН3*, рН7*, рН9* – змінювали значення рН після 48 год культивування

Аналізуючи результати діаграми видно, що приріст біомаси за оптичною густиною при зміні рН на 0 год культивування *L. acidophilus* УКМ В – 2691 становив 0,109 – 1,608 у.о. Після зміни рН у зразках на 48 год спостерігали збільшення рівня біомаси за рН 3* та 9*, які становили 0,492 та 1,676 відповідно. Тоді як рН 7* не змінювала результати, бо є найбільш наближеним до контрольного значення. Оскільки ми перевіряли рівень накопичення біомаси непрямим методом за допомогою спектрофотометра можемо робити висновок, що збільшувалась мутність культуральної рідини в якій знаходилась біомаса та її метаболіти. Вміст екзополісахаридів перевіряли осадженням спиртом з подальшим зважуванням та висушуванням осаду (рис. 4).

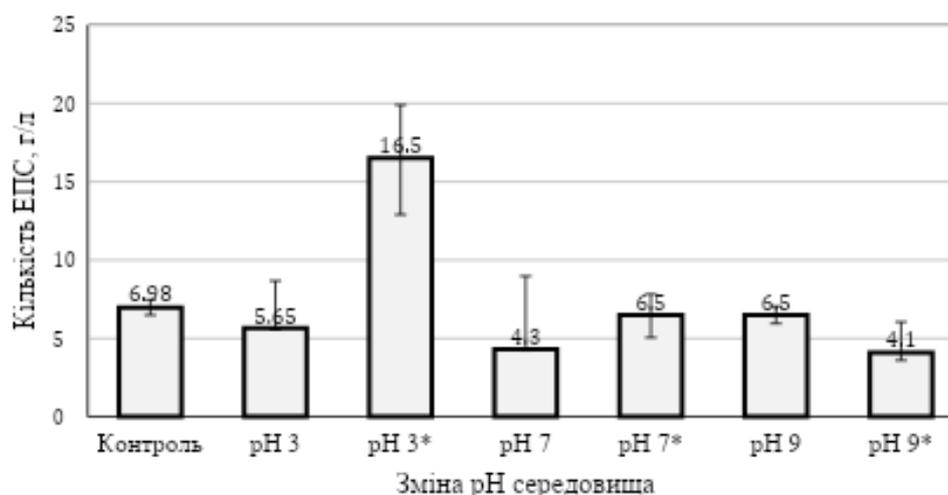


Рис.4. Вплив рН на накопичення ЕПС *L. acidophilus* УКМ В – 2691: Контроль – вирощували за початкового рН 6, t 37°C, 160 об/хв, 96 год, рН 3, 7, 9 – змінювали значення рН на початку культивування, рН3*, рН7*, рН9* – змінювали значення рН після 48 год культивування

Висновки. Встановлено що температура змінена після накопичення біомаси за 37°C, 160 об/хв на 30°C без перемішування сприяє збільшенню виходу ЕПС (7,73 г/л) у порівнянні з контролем (6,89 г/л). При зниженні рН до 3 після 48 год отримано максимум ЕПС – 16,5 г/л, тоді як у контролі фіксується у 2,5 рази менше (6,89 г/л). Кисле середовище викликає стрес і посилює синтез екзополісахаридів. Контроль фізичних параметрів середовища є ключовим для інтенсифікації біосинтезу ЕПС та підвищення продуктивності молочнокислих бактерій.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Oleksy M, Klewicka E. Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* sp.: Biosynthesis and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2017. V. 58, № 3. P. 450–462. doi: 10.1080/10408398.2016.1187112.
2. Voloshyna I.M., Shkotova L.V., Skorokhod S.O., Appolonova I.Ye., Zholobak N.M. *Lactobacillus* Bacteria: Biological and Therapeutic Properties. *Mikrobiol. Z.* 2019. 81(6). P. 131 – 146. doi.org/10.15407/mikrobiolj81.06.131
3. Yadav M.K., Song J.H., Vasquez R., Lee J.S., Kim I.H., Kang D.K. Methods for detection, extraction, purification, and characterization of exopolysaccharides of lactic acid bacteria – a systematic review. *Foods*. 2024 № 19(13), P. 3687. – doi: 10.3390/foods13223687.
4. Mohamed Y. M. I., Reehana N., Jayaraj K. A., Ahamed A. A. P., Dhanasekaran D., Thajuddin N., Alharbi N. S., Muralitharan G. Statistical optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus plantarum* NTMI05 and NTMI20. *International J. of Biological Macromolecules*. 2016. V. 93. P. 731–745. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.09.007.

1.20 СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО АНАЛІЗУ СУБСТАНЦІЙ БІОЛОГІЧНИХ/БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ З ВИКОРИСТАННЯМ МЕТОДУ ВЕРХ

Вельчинська О. В., Ніженковська І. В., Мелешко Р. А.

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Україна
elena_wwu@ukr.net, iryna.nizhenkovska@gmail.com, rama8376@ukr.net

Основним завданням даної роботи була адаптація умов хроматографування методом ВЕРХ з модифікацією методик дослідження та оцінкою ефективності хроматографічних колонок і нерухокої фази із різними характеристиками, оптимальних параметрів рухокої фази для аналізу чистоти субстанції лікарського засобу біологічного/біотехнологічного походження кларитроміцину.

Ключові слова: кларитроміцин, антибіотик, ВЕРХ, аналіз чистоти субстанції, умови хроматографування.

Біологічні лікарські засоби охоплюють широкий спектр препаратів: вакцини, сироватки, антибіотики, ферменти та інші засоби, що отримують із живих організмів (бактерій, грибів, вірусів, рослин, тварин або їх тканини). Різноманітність антибіотиків за хімічною будовою і складністю молекулярної структури та напрямками їхньої фармакологічної активності спонукала науковців до розробки різноманітних підходів до фармацевтичного аналізу цих препаратів, оскільки, антибіотики – це хімічні речовини, які продукуються мікроорганізмами або синтезуються організмом людини. У зв'язку із цим виникла необхідність розширення кола інструментальних методів дослідження антибіотиків та впровадження нових більш ефективних, чутливих і високоселективних методів [1–5].

Кларитроміцин – це антибіотик із групи макролідів, який є похідною еритроміцину. Кларитроміцин використовується для лікування бактеріальних інфекцій, проявляє токсичність у певних дозах. Молекула кларитроміцину складається із 14 – членного лактонового кільця, пов'язаного з двома молекулами цукру. Молекула кларитроміцину відрізняється від молекули еритроміцину О – метильним розміщенням у положенні 6 лактонового кільця, яке визначає кислотостійкість і покращує протимікробні і фармакокінетичні властивості цієї речовини [6–9]. Державна Фармакопея України (ДФУ) регламентує аналіз супровідних домішок у складі субстанції кларитроміцину методом рідинної хроматографії (РХ) [10].

Метою даного експериментального дослідження є адаптація умов хроматографування методом вискоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), модифікація методик дослідження та оцінка ефективності хроматографічних колонок і нерухокої фази, оптимальних параметрів рухокої фази для визначення чистоти субстанції лікарського засобу

біологічного/біотехнологічного походження кларитроміцину та підтвердження її якості. **Об'єкт дослідження** – адаптація умов хроматографування методом ВЕРХ та методик дослідження зразків випробовуваної субстанції кларитроміцину. **Предмет дослідження** – зразки випробовуваної субстанції кларитроміцину.

Методи та матеріали

ВЕРХ, хроматограф Agilent 1260 Infinity II з УФ детектором, колонка ZORBAX EclipsePlus C18, 150x4,6x5 з температурою 40°C, комп'ютерний аналіз – програма OpenLab CDS; зразки субстанції кларитроміцину, фармакопейний зразок ДФУ кларитроміцину, реагенти та розчинники (чистоти для ВЕРХ): ацетонітрил *P*, кислота фосфатна *P*, калію дигідрофосфат *P*, вода для хроматографії *P*.

Результати

Фармакопейним методом аналізу субстанцій синтетичних лікарських засобів та лікарських засобів біологічного/біотехнологічного походження є метод РХ [10, 11]. За допомогою методу РХ виконують ідентифікацію активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ), визначають чистоту та супровідні речовини у складі випробовуваної субстанції. Нами впроваджено у практику фармацевтичного аналізу випробовуваних субстанцій більш ефективний та селективний метод ВЕРХ із високою ідентифікаційною здатністю для підвищення результативності і ефективності аналізу [12–15].

Хроматографічні дослідження супровідних домішок зразків субстанції кларитроміцину проводили на хроматографі Agilent 1260 Infinity II з УФ детектором (детектування – УФ при 205 нм), з колонкою – ZORBAX EclipsePlus C18, 150x4,6x5 (40°C). Використовували умови хроматографування: температура зразка – кімнатна, потік – 1,5 мл/хв, об'єм інжекції – 10 мкл. У якості рухомих фаз використовували: фазу А – розчин 4,6 г/л калію дигідрофосфату *P*, рН 4.4 (за допомогою фосфорної кислоти *P*), фазу В – ацетонітрил *P*. Градієнти представлено у таблиці 1.

Таблиця. Градієнти

| | | | | | |
|-----------------------|----|----|----|----|----|
| Час (хв) | 0 | 32 | 34 | 45 | 56 |
| Рухома фаза А (% V/V) | 75 | 40 | 40 | 75 | 75 |
| Рухома фаза В (% V/V) | 25 | 60 | 60 | 25 | 75 |

Час процедури хроматографування – 56 хв.

Випробовуваний зразок субстанції готували розчиненням 75,0 мг у 25 мл ацетонітрилу *P1*, доводили до об'єму 50 мл водою *P*.

Розчини порівняння готували наступим чином: розчин порівняння (а): 75,0 г стандартного зразку ДФУ кларитроміцину розчиняли у 25 мл ацетонітрилу *P1*, доводили об'єм розчину до 50 мл водою *P*; розчин порівняння (b): 5,0 мл розчину порівняння (а) довели сумішшю рівних об'ємів ацетонітрилу *P1* і води *P* до об'єму 100,0 мл; розчин порівняння (с):

1,0 мл розчину порівняння (b) довели сумішшю рівних об'ємів ацетонітрилу *PI* і води *P* до об'єму 10,0 мл.

Для проведення комп'ютерного аналізу та інтерпретації отриманих результатів використовували програму OpenLab CDS. Для дослідження використовували базові валідовані фармакопейні методики.

Проведена оцінка ефективності хроматографічної колонки для виконання хроматографування випробовуваної субстанції. Знайдено, що колонка для ВЕРХ більшої довжини та з модифікованою С18 фазою забезпечувала краще розділення піків. Зміна часу хроматографування, часових параметрів градієнту та відсотковий вміст (в межах, які дозволено ДФУ) позитивно вплинули на форму піків та їх розділення. В результаті проведених досліджень встановлено, що зразки випробовуваної субстанції кларитроміцину містять із регламентованих Фармакопесю 16 домішок – 9 специфікованих домішок (J, N, E, F, P, O, K, G, H), сумарний вміст яких не перевищує 3%, що є прийнятним для використання субстанції антибіотика при виробництві лікарських засобів. Як видно із записаних хроматограм, нам вдалося підібрати оптимальні умови для розділення супровідних домішок з урахуванням їх фізико – хімічних властивостей (рис. 1, 2).

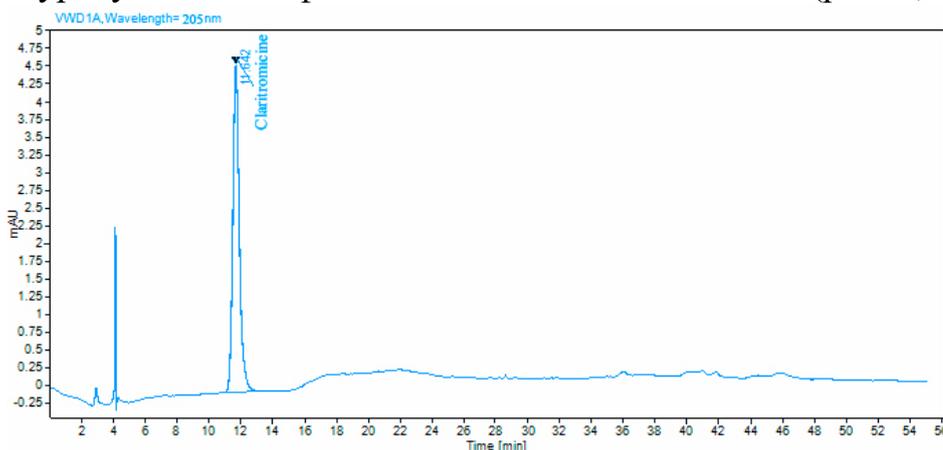


Рис. 1 Стандартний зразок ДФУ (с) субстанції кларітроміцину (Rt=11,642 хв)

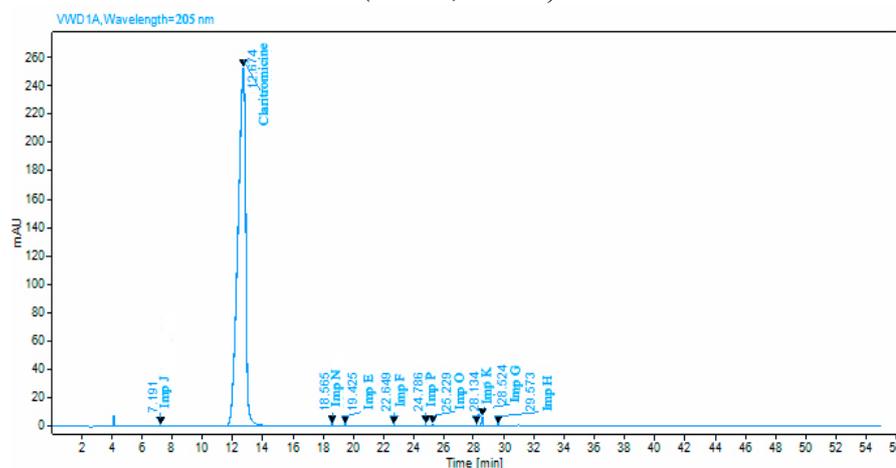


Рис. 2. Випробовуваний зразок субстанції кларітроміцину (Rt=12,674 хв); домішки: J (Rt=7,191 хв), N (Rt=18,565 хв), E (Rt=19,425 хв), F (Rt=22,649 хв), P (Rt=24,786 хв), O (Rt=25,229 хв), K (Rt=28,134 хв), G (Rt=28,524 хв), H (Rt=28,524 хв)

Висновки. З метою підвищення ефективності та результативності аналізу субстанцій лікарських засобів біологічного/біотехнологічного походження актуальним завданням залишається імплементація сучасних чутливих і високоселективних інструментальних методів у практику фармацевтичного аналізу, наприклад методу ВЕРХ та його комбінацій.

Адаптовано умови хроматографування методом ВЕРХ з модифікацією методик дослідження та оцінкою ефективності хроматографічних колонок і нерухомої фази із різними характеристиками, оптимальних параметрів рухомої фази на основі валідованих фармакопейних методик для аналізу чистоти субстанції кларитроміцину. Знайдено, що колонка для ВЕРХ більшої довжини та з модифікованою С18 фазою забезпечувала краще розділення піків. Зміна часу хроматографування, часових параметрів градієнту та відсотковий вміст (в межах, які дозволено ДФУ) позитивно вплинули на форму піків та їх розділення.

В результаті проведених досліджень встановлено, що зразки випробовуваної субстанції кларитроміцину містять із регламентованих Фармакопеею 16 домішок – 9 специфікованих домішок (J, N, E, F, P, O, K, G, H), сумарний вміст яких не перевищує 3%, що є прийнятним для використання субстанції антибіотика при виробництві лікарських засобів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Southern K.W., Solis – Moya A., Kurz D., Smith S. Macrolide antibiotics (including azithromycin) for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2024. Vol.2, N 2. CD002203.
2. Zimmermann P., Ziesenitz V.C., Curtis N., Ritz N. The Immunomodulatory Effects of Macrolides – A Systematic Review of the Underlying Mechanisms. *Front Immunol.* 2018. N 9. P.302. doi: 10.3389/fimmu.2018.00302.
3. Duration of Antibiotic Therapy as Part of Maximal Medical Therapy for Chronic Rhinosinusitis. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01825408>. Accessed 31 Aug 2018.
4. Workowski K.A., Bachmann L.H., Chan P.A., Johnston C.M., Muzny C.A., Park I., Reno H., Zenilman J.M., Bolan G.A. Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines. *MMWR Recomm. Rep.* 2021. Vol. 70, N 4. P. 1–187.
5. Min H.K., Lee S., Kim S. et al. Global incidence and prevalence of chronic rhinosinusitis: a systematic review. *Clin. Exp. Allergy.* 2025. N 55. P. 52–66.
6. Philpott C. le Conte, S. Beard D. et al., and the MACRO Programm Team. Clarithromycin and endoscopic sinus surgery for adults with chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps: study protocol for the MACRO randomised controlled trial. *Trials.* 2019. N 20. P. 246.
7. Thomas D., McDonald V.M., Stevens S., Baraket M., Hodge S., James A., Jenkins C., Peters M., Reynolds P.N., Upham J.W., Yang I.A., Gibson P.G. Effect of Azithromycin on Asthma Remission in Adults With Persistent Uncontrolled Asthma: A Secondary Analysis of a Randomized, Double – Anonymized, Placebo – Controlled Trial. *Chest.* 2024. Vol. 166, N 2. P. 262–270.
8. Corrigendum to: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA): 2020 Guideline on Diagnosis and Management of Babesiosis. *Clin. Infect. Dis.* 2021. Vol. 73, N 1. P. 172–173.
9. Krause P.J., Auwaerter P.G., Bannuru R.R., Branda J.A. et al. Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA): 2020 Guideline on Diagnosis and Management of Babesiosis. *Clin. Infect. Dis.* 2021. Vol.72, N 2, e49–e64.

10. Державна Фармакопея України. 2 – ге вид., у 3 – х т. Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». Х.: Укр. наук. фармакоп. центр якості лік. засобів. 2014. Т. 2. С. 359–362.
11. European Pharmacopoeia. 2022 (11 – th ed.). Council of Europe, Strasbourg: EDQM. Vol. II. P. 2359–2361.
12. Вельчинська О., Ніженковська І., Мелешко Р. Сучасні підходи до фармацевтичного аналізу методом ВЕРХ алкалоїду паклітакселу. *Фітотерапія. Часопис*. 2024. N 3, 168–174, doi: <https://doi.org/10.32782/2522-9680-2024-3-168>.
13. Вельчинська О., Малюта Н. Застосування з варіацією параметрів експерименту методу ВЕРХ у фармацевтичний аналіз субстанції аскорбінової кислоти. *Сучасна медицина, фармація та психологічне здоров'я*. 2025. Вип. 1, №19. С. 120–125. DOI: <https://doi.org/10.32689/2663-0672-2025-1>.
14. Вельчинська О., Мелешко Р., Ніженковська І., Горай Т. Використання методу ВЕРХ для дослідження суміші субстанцій із вмістом ацикловіру та гідрокортизону. *Сучасна медицина, фармація та психологічне здоров'я*. 2024. Вип. 3, №17. С. 51–59.
15. Welchinska E. & Vilchynska V. New compound N1,N1' – (2» – bromo – 2» – chloroethenyl) – bis – (5 – fluorouracil) as the active antitumor agent for sarcoma 180. *CBU International conference proceedings 2016: Innovations in Science and Education*. 2016. Vol. 4. P. 740–743. DOI 10.12955/cbup.v4.842.

1.21 МАТЕМАТИЧНЕ МОДЕЛЮВАННЯ ПРОЦЕСУ ЕКСТРАГУВАННЯ ЦІЛЮВИХ КОМПОНЕНТІВ З БІОМАСИ ДРІЖДЖІВ

Волошкевич П. П., Пукач П. Я., Корендій В. М.,
Гриценко О. М., Кунинець А. В.

Національний університет «Львівська політехніка», Україна
petro.p.voloshkevych@lpnu.ua

На основі експериментальних досліджень розроблено узагальнену математичну модель процесу екстракції цільових компонентів з біомаси дріжджів. Встановлено, що теоретичні положення задовільно узгоджуються з результатами досліджень. Одержана модель дозволяє з достатньою точністю описати кінетику вилучення вуглеводів, ліпідів та РНК з біомаси дріжджів, визначати вихід екстракту та прогнозувати оптимальний час екстракції з метою оптимізації та інтенсифікації процесу, особливо на етапі проектування екстракційних апаратів.

Ключові слова: *математичне моделювання, екстракція, дріжджі, рибонуклеїнова кислота, біоактивні сполуки.*

Прогнозування результатів експерименту за допомогою математичного моделювання є особливо актуальним та важливим під час дослідження дифузійних та екстракційних процесів, які широко використовуються в галузі біотехнології, харчових виробництв та сільському господарстві [1 – 3]. Процес екстракції відрізняється від інших методів вилучення та розділення такими перевагами, як висока ефективність та вибірковість; низькі робочі температури; рентабельність вилучення цінних компонентів та шкідливих домішок із розведених розчинів; можливість вигідного поєднання з ректифікацією, хімічним осадженням; відносна простота апаратурного оформлення; можливість повної автоматизації ведення процесу [2]. Процес екстракції є одним з найбільш ефективних методів розділення сумішей та виділення продуктів у чистому вигляді [2, 4]. Зокрема екстракцію використовують для видалення молочної кислоти і антибіотиків з ферментативних розчинів, ліпідних та білкових компонентів з клітинної маси, компонентів з рослинної сировини (насіння оливних культур, цукровий буряк, фрукти) [5 – 7]. На практиці в технологічних виробництвах часто постає завдання апаратурно – технологічного оформлення цих процесів, внаслідок чого виникає потреба у їх моделюванні.

Одержання цінних продуктів на основі переробки біомаси є одним з перспективних напрямків мікробіологічної, фармацевтичної, хімічної та інших галузей промисловості. Дріжджі є багатим джерелом білків, антиоксидантів, вітамінів та інших біоактивних сполук [8].

Одним з важливих продуктів, які можливо отримати з біомаси дріжджів є рибонуклеїнові кислоти (РНК) [9], які знаходять поширене

використання, як сировина для виготовлення рибонуклеотидів, нуклеотидів та різноманітних фармакологічних препаратів. Тому одержання високоочищеної РНК в поєднанні з біологічною активністю є, на даний час, актуальною проблемою, зокрема використовуючи метод екстракції без використання хімічних реагентів, що забезпечує можливість більш повно і комплексно використовувати кормові дріжджі [10].

На даний час теоретичні основи цього процесу вивчені недостатньо. Відсутня комплексна модель процесу, що враховує мембранні властивості оболонки біомаси дріжджів та можливості керованої екстракції. Актуальним завданням також є інтенсифікація технологічних процесів екстрагування. Інтенсифікація полягає у прискоренні та повному використанні взаємодіючих речовин. Для того, щоб оцінити вплив різних факторів на окремі стадії процесу екстрагування та їх сукупну дію в цілому, необхідно виразити ці залежності за допомогою математичних моделей, які дозволять розрахувати параметри процесу та знайти оптимальні режими його проведення. Реалізація інтенсифікованого процесу екстракції цільових компонентів з біомаси дріжджів пов'язана з отриманням розрахункових рівнянь, що дозволяють визначити тривалість екстракції та раціональні параметри режиму екстракції. Моделювання процесу екстрагування дозволить вивчити його на стадії проектування при тих чи інших технологічних параметрах.

Таким чином метою даної роботи було розробити адекватну математичну модель процесу екстрагування цільових компонентів з біомаси дріжджів.

Як розчинники для досліджень використовували гексан марки «ч», етанол технічний та дистильовану воду.

Для встановлення кінетичних закономірностей вилучення вуглеводів та ліпідів з біомаси дріжджів використовували установку, схема якої представлена на рис.1. Установка містить з апарат з мішалкою, термостат та електропривід. З метою запобігання випаровування розчинника в кришці апарата встановлено зворотний холодильник, а на валу мішалки передбачено гідрозатор.

Для забезпечення інтенсивного перемішування застосовували чотирилопатеву мішалку, яка обертається від електродвигуна за допомогою клинопасової передачі. Контроль температури здійснювали за допомогою термометра, підтримування постійної температури експерименту забезпечувалось термостатом. Експеримент проводили за температур 20, 40 та 60°C, а також за різних співвідношень твердої та рідкої фаз відповідно т.ф. : р.ф. = 1:3 і т.ф. : р.ф. = 1:10. Кожну нову партію біомаси дріжджів аналізували на вихідний вміст у ній вуглеводів та ліпідів.

Методика проведення експериментів полягала у наступному. Наважку біомаси дріжджів (залежно від прийнятого співвідношення фаз) рівну 1000г і 300г завантажували в апарат з мішалкою, у який подавався розчинник, попередньо нагрітий до температури досліджу, в кількості, що забезпечує прийняте співвідношення фаз. Через певні проміжки часу за допомогою

спеціального пробовідбірника відбиралися проби, які фільтрувалися та аналізувалися на вміст у них вуглеводів та ліпідів.

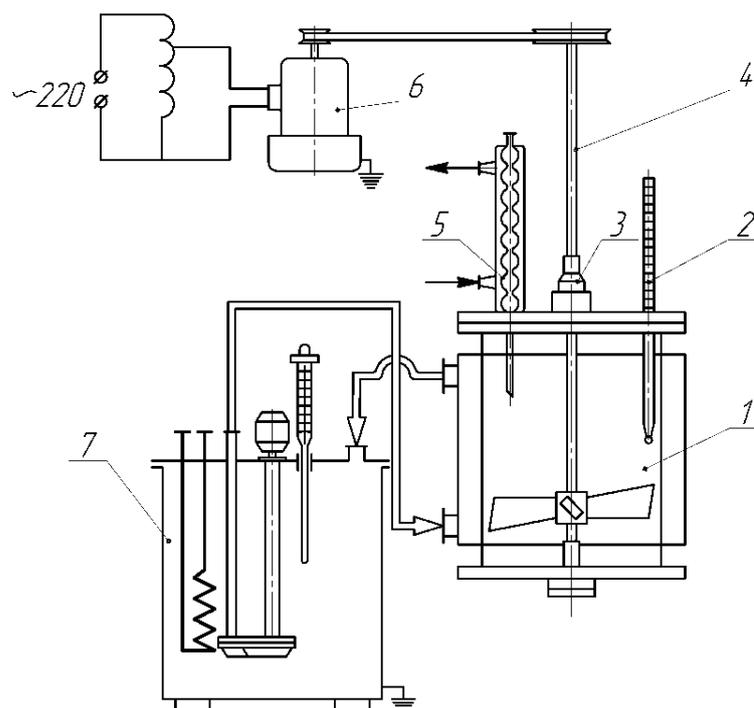


Рис. 1. Схема експериментальної установки:

1 – апарат; 2 – термометр; 3 – гідрозатвор; 4 – лопатева мішалка;

5 – зворотний холодильник; 6 – електропривід; 7 – термостат

Вилучення цільових компонентів з біомаси дріжджів (вуглеводи, ліпіди, РНК тощо), з кінетичної точки зору, має складний характер. Швидкість вилучення цільових компонентів у початковий період часу є відносно великою, після чого вона значно сповільнюється. Таким чином, всю масу екстрагованих компонентів, що знаходяться в частинці біомаси дріжджів, можна розділити на дві частини. Перша частина видаляється відносно легко через відсутність бар'єрів, які перешкоджають проникненню через них як розчинника, так і екстрагованої речовини. Друга ж частина важче переходить в розчин, оскільки є більш ізольованою.

Розраховані на основі звичайних теоретичних рішень коефіцієнти дифузії характеризуються порядком $10 - 15 - 10 - 16 \text{ м}^2/\text{с}$, що на $7 - 5$ порядків є меншим за коефіцієнти вільної дифузії вуглеводів. Низькі коефіцієнти дифузії можна пояснити впливом певних чинників – будова клітини біомаси дріжджів, її природа, агломерація клітин біомаси під час сушіння тощо. Клітина дріжджів є відділеною від навколишнього середовища механічно міцною клітинною стінкою товщиною до $(16 - 25) \times 10^{-12} \text{ м}$. Клітинна стінка іноді досягає $1/7$ діаметра клітини і становить при цьому від 15% до 30% її сухої ваги [11].

Під час вивчення розподілення вуглеводів та ліпідів в різних складових клітини дріжджів було встановлено, що на поверхні клітини знаходиться

вуглеводів від 18% до 30%, ліпідів – від 6% до 21%; в оболонці клітини – вуглеводів – 9÷60%, ліпідів – 30÷80%.

Результати досліджень показують, що клітинна діафрагма ділить клітину на два різні об'єми (внутрішній, сильно ізольований, та зовнішній), екстракція з яких відбувається з різною швидкістю. Для створення математичної моделі процесу екстрагування цільових компонентів з біомаси дріжджів прийmemo, що під час взаємодії розчинника з біомасою утворюється розчин із значною концентрацією, який обмежений в клітині. В подальшому розчинена речовина дифундує в оточуючу рідину через пористу перегородку клітинної оболонки. Саме діафрагма клітини створює основний опір перенесенню речовини. Діафрагма клітини поділяє клітину на два різні об'єми – внутрішній і зовнішній, вивільнення з яких буде відбуватись із різними швидкостями [12]. Саме на цьому чиннику і побудована математична модель процесу вивільнення цільових компонентів з біомаси дріжджів. Для математичного опису процесу прийнята модель сферичної клітини, що дозволяє спростити задачу (рис. 2).

Під час взаємодії біомаси з розчинником, всередині клітини утворюється розчин з концентрацією C_1 , потім розчинена речовина поширюється в середовище, яке безпосередньо контактує з клітинною стінкою, концентрація якого становить C_2 . З цього середовища розчинена речовина дифундує в основну частину розчину з концентрацією C . З рис. 2 видно, що основний опір вилученню цільових компонентів створює клітинна стінка (аналогічно будь – якому мембранному процесу), що відповідає найвищому градієнту концентрації.

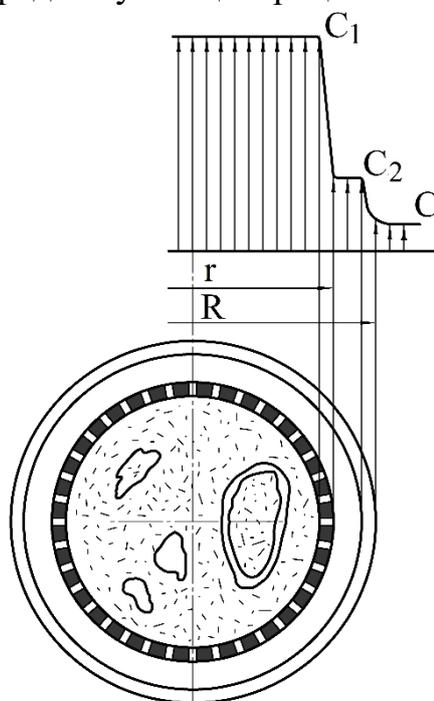


Рис. 2. Модель сферичної клітини біомаси дріжджів

Зміна кількості речовини всередині клітини в часі може бути визначена за рівнянням:

$$-\frac{4}{3}\pi R^3 \frac{dC_1}{d\tau} = 4\pi R^2 K_1 (C_1 - C_2), \quad (1)$$

яке після перетворення має вигляд:

$$-\frac{dC_1}{d\tau} = \frac{3K_1}{R} (C_1 - C_2) \quad (2)$$

Зміна вмісту речовини у внутрішній частині клітини, в межах $R - r$, визначається з рівняння:

$$-\frac{4}{3}\pi(R^3 - r^3) \frac{dC_1}{d\tau} = K_2 C_2 4\pi R^2 - (C_1 - C_2) K_1 4\pi r^2 \quad (3)$$

Права частина рівняння (3) враховує прихід речовини в зовнішню частину клітини і зменшення речовини поза її межами. Дане рівняння після перетворення має вигляд:

$$-\left(1 - \frac{r^3}{R^3}\right) \frac{dC_1}{d\tau} = \frac{3K_2}{R} C_2 - \frac{3K_1}{r} \cdot \frac{r^3}{R^3} (C_1 - C_2) \quad (4)$$

Введемо наступне позначення: $\frac{r^3}{R^3} = \alpha$, отримаємо:

$$-(1 - \alpha) \frac{dC_1}{d\tau} = \frac{3K_2}{R} C_2 - \alpha \frac{3K_1}{r} (C_1 - C_2) \quad (5)$$

Прийmemo наступні позначення:

$\tau' = \frac{3K_1 t}{r}$; $\frac{\alpha}{(1-\alpha)} = \delta$; $\beta = \frac{K_2}{K_1} \cdot \frac{r}{R} \cdot \frac{1}{(1-\alpha)}$; $\delta + \beta + 1 = 2m$, $K_1 = \frac{D_1}{\delta}$; $K_2 = \frac{D_2}{\delta}$
де D_1 і D_2 – коефіцієнти дифузії цільових компонентів.

З врахуванням прийнятих позначень рівняння (2) та (3) після деяких перетворень набувають вигляду:

$$-\frac{dC_1}{d\tau'} = (C_1 - C_2) \quad (6)$$

$$-\frac{dC_2}{d\tau'} = \beta C_2 - \delta (C_1 - C_2) \quad (7)$$

$$-\frac{dC_2}{d\tau'} = \beta C_2 + \delta \frac{dC_1}{d\tau'} \quad (8)$$

Після розв'язування рівнянь (6) – (8) операційним методом, отримуємо:

$$\frac{C_1}{C_0} = \frac{P_1 - 2m}{P_1 - P_2} e^{-P_1 \tau'} + \frac{P_2 - 2m}{P_1 - P_2} e^{-P_2 \tau'} \quad (9)$$

$$\frac{C_2}{C_0} = \frac{P_1 - 1 - \delta}{P_1 - P_2} e^{-P_1 \tau'} + \frac{P_2 - 1 - \delta}{P_1 - P_2} e^{-P_2 \tau'} \quad (10)$$

де $P_{1,2} = -m \pm \sqrt{m^2 - \beta}$, C_0 – початкова концентрація екстрагованого компонента.

Позначимо загальний вміст цільових компонентів, який відповідає певному τ через M , тоді:

$$M = C_1 \frac{4}{3} \pi r^3 + C_2 \frac{4}{3} \pi (R^3 - r^3) \quad (11)$$

Початковий вміст цільових компонентів позначимо через M_0 , тоді:

$$M_0 = C_0 \frac{4}{3} \pi R^3; \quad (12)$$

Відношення поточного вмісту цільових компонентів до початкового їх вмісту в клітині можливо представити у вигляді:

$$\frac{M}{M_0} = (1 - \alpha) \frac{C_1 \delta + C_2}{C_0} \quad (13)$$

З врахуванням рівнянь (9) і (10) рівняння (13) набуває наступного вигляду:

$$\frac{M}{M_0} = (1 - \alpha) \left[\frac{\delta(P_1 - 2m) + P_1 - 1 - \delta}{P_1 - P_2} e^{-P_1 \tau} + \frac{(P_2 - 2m) + P_2 - 1 - \delta}{P_1 - P_2} e^{-P_2 \tau} \right] \quad (14)$$

Позначимо:

$$A = \frac{\delta(P_1 - 2m) + P_1 - 1 - \delta}{P_1 - P_2}; \quad P_1 = a \quad (15)$$

$$B = \frac{\delta(P_2 - 2m) + P_2 - 1 - \delta}{P_1 - P_2}; \quad P_2 = b \quad (16)$$

Тоді рівняння (14) набуває кінцевого вигляду:

$$\frac{M}{M_0} = 1 - \frac{C}{C_{max}} = A e^{-a\tau} + B e^{-b\tau} \quad (17)$$

Виділення коефіцієнтів А, В, а, b у рівнянні (17) здійснювали методом швидкого спуску при пошуку мінімуму квадратичної форми:

$$S = \sum_{i=l}^n \left[\left(\frac{M}{M_0} \right)_e - \left(\frac{M}{M_0} \right)_t \right]^2 \quad (18)$$

де $\left(\frac{M}{M_0} \right)_e$ – експериментальне значення відносного вмісту цільових компонентів у клітині біомаси дріжджів; $\left(\frac{M}{M_0} \right)_t$ – теоретичне значення відносного вмісту цільових компонентів в клітині біомаси, розраховані за рівнянням (17).

Із співвідношення (18) можна зробити висновок, що

$$S = F(A, a, b) \quad (19)$$

Мінімум функції S відповідає найкращому середньоквадратичному відхиленню значення шуканих параметрів рівняння (17).

Таблиця 1. Метод швидкого спуску був реалізований з наступними значеннями коефіцієнтів

| № п/п | Цільовий компонент | A_{1-3} | a_{1-3} | B_{1-3} | b_{1-3} |
|-------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | Вуглеводи | 0,895 | 0,55 | 0,105 | 0,029 |
| 2 | Ліпіди | 0,900 | 0,45 | 0,100 | 0,035 |
| 3 | РНК | 0,889 | 0,059 | 0,113 | 0,00165 |

На рис. 3 представлені криві кінетики вилучення вуглеводів, ліпідів та рибонуклеїнових кислот, розраховані за рівнянням (17), а також експериментальні дані. На рис. 4 наведено кореляційну залежність отриманих результатів.

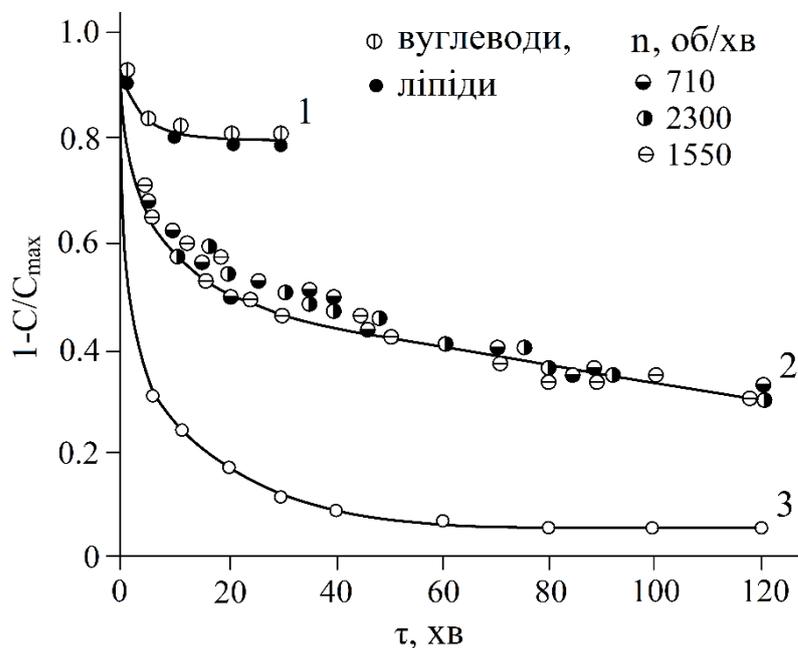


Рис. 3. Кінетика вивільнення вуглеводів, ліпідів та рибонуклеїнових кислот з біомаси дріжджів (суцільні лінії – значення, розраховані за рівнянням (17), точки – експериментальні значення):

1 – вивільнення з біомаси дріжджів вуглеводів і ліпідів (екстрагент – гексан); 2 – вивільнення суміші вуглеводів і ліпідів з окремих клітин біомаси дріжджів при різних частотах обертання мішалки (екстрагент – етанол); 3 – вивільнення РНК з біомаси дріжджів (екстрагент – вода)

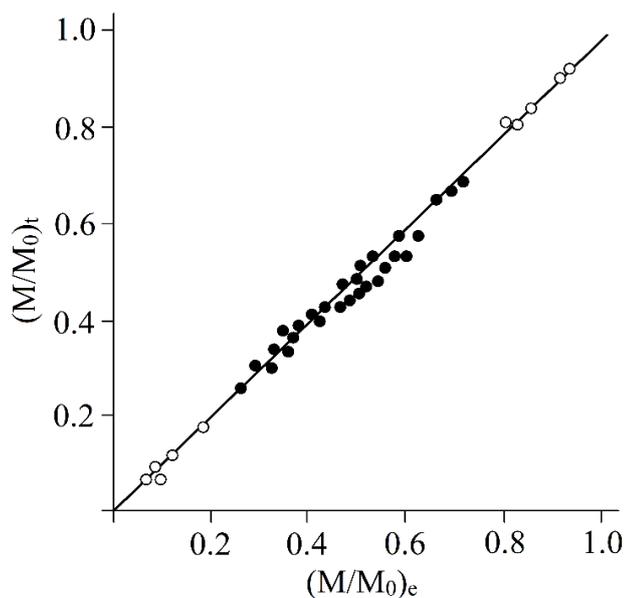


Рис. 4. Кореляційна залежність експериментальних і теоретичних результатів, отриманих під час екстрагування цільових компонентів з біомаси дріжджів

Аналіз наведених даних показує, що теоретичні положення, на основі яких отримано аналітичну функцію, що містить дві експоненти, задовільно узгоджується з експериментальними результатами.

Експерименти екстрагування цільових компонентів з біомаси дріжджів проводили на установці, що складається з апарату з мішалкою, при постійній температурі за наступною методикою. Наважка біомаси завантажувалася в апарат з мішалкою, після чого в апарат заливали екстрагент за певної постійної температури.

Як екстрагент використовували гексан, етанол, воду. Через певні проміжки часу за допомогою спеціального пробовідбірника відбирали проби, які фільтрувалися та аналізувалися на вміст у них вуглеводів, ліпідів та РНК за відповідними методиками. На рис. 5 наведено результати отриманих експериментальних значень концентрацій при вилученні з біомаси дріжджів вуглеводів, ліпідів та РНК.

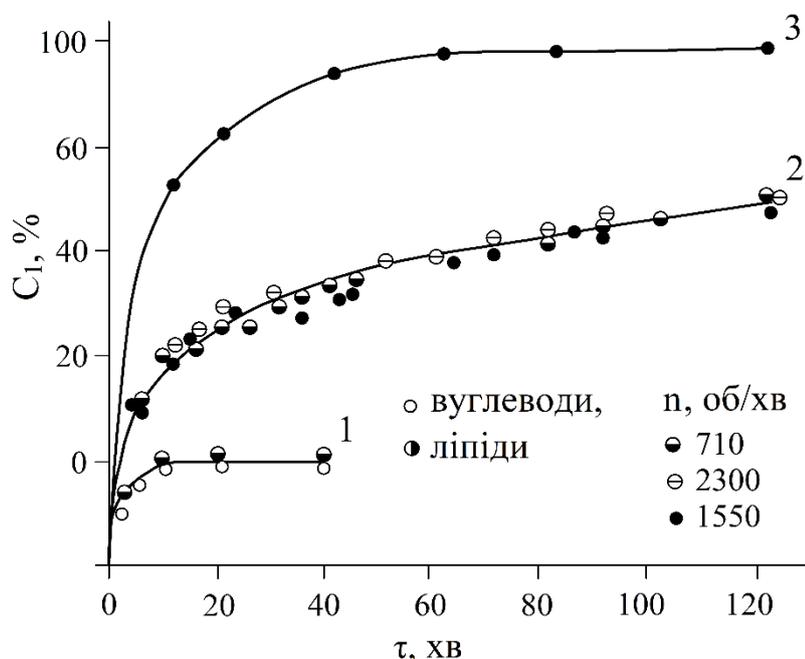


Рис. 5. Кінетика вивільнення вуглеводів, ліпідів та рибонуклеїнових кислот з біомаси дріжджів:

1 – вивільнення з біомаси дріжджів вуглеводів і ліпідів; 2 – вивільнення суміші вуглеводів і ліпідів з окремих клітин біомаси дріжджів при різних частотах обертання мішалки; 3 – вивільнення РНК з біомаси дріжджів (екстрагент – вода)

На основі аналізу даних, представлених на рис. 3 та рис. 5, встановлено, що найбільший ступінь вилучення вуглеводів і ліпідів досягається з окремих клітин (крива 2). Додатковий опір, який виникає при утворенні агломератів клітин у процесі сушіння є причиною порівняно низького рівня вилучення зазначених компонентів з частинок біомаси. Високий ступінь вилучення РНК пояснюється тим, що в процесі екстрагування застосовується як екстрагент вода, в якій частинки біомаси розпадаються на окремі клітини і при підвищених температурах руйнуються.

Таким чином, рівняння (17) може бути використане для прогнозування кінетики вилучення цільових компонентів з таких складних у дифузійному відношенні структур, якими є частинки біомаси дріжджів.

Висновки. Розроблено математичну модель вилучення цільових компонентів із біомаси дріжджів. Переверено адекватність розробленої моделі та встановлено можливість її використання для прогнозування кінетики вилучення вуглеводів, ліпідів, РНК з біомаси.

Показано, що процес екстрагування вуглеводів і ліпідів контролюється внутрішньою дифузією. Найвищий ступінь вилучення досягається у випадку екстрагування з окремих клітин, тоді як утворення агрегатів клітин ускладнює процес. Екстрагування РНК із використанням води, як екстрагента, відбувається інтенсивніше, оскільки за підвищених температур клітинні стінки руйнуються, що забезпечує більш повне вивільнення нуклеїнових кислот.

Розроблена математична модель дає змогу визначати оптимальні параметри процесу екстракції, прогнозувати його тривалість і вихід продукту, а також використовувати її для комп'ютерного проектування апаратів для екстрагування біоактивних речовин з дріжджової біомаси. Вона може бути основою для подальшої оптимізації процесів у біотехнологічних виробництвах та сприяти інтенсифікації отримання природних біоактивних компонентів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Nagursky O., Gumnitsky Ya. Release of capsulated mineral fertilizers components. Process simulation. *Chem. Chem. Technol.* 2012. № 6(3). P. 320–325.
2. Fedoryshyn O., Petrina R., Krvavych A., Hubrii Z., Atamanyuk V. Research on aspects of the extraction kinetics of metabolites of *carlina acaulis* while mixing. *Vopr. Khimii Khimicheskoi Tekhnologii.* 2023. № 1. P. 3–10.
3. Nagursky O., Krylova H., Vasiichuk V., Kachan S., Dziurakh Y., Nahursky A., Paraniak N. Safety usage of encapsulated mineral fertilizers based on polymeric waste. *Ecological Engineering & Environmental Technology.* 2022. № 23(1). P. 156–161.
4. Matskiv O., Znak Z., Vasiychuk V., Nagursky O., Kurylets O. Determination of the composition and study of the extraction of iron compounds from organochlorine wastes of vinyl chloride production. *Vopr. Khimii Khimicheskoi Tekhnologii.* 2023. № 2. P. 99–107.
5. Olivares – Galván S., Marina M., García M. Extraction and characterization of antioxidant peptides from fruit residues. *Foods.* 2020. № 9. P. 1018.
6. Ilgaz C., Kelebek H., Kadiroglu P. Ultrasound – assisted extraction of hydroxytyrosol from *Lactiplantibacillus plantarum* fermented olive leaves: process optimization and bioactivity assessment. *Fermentation.* 2023. № 9. P. 514.
7. Yang J., Yan Z., Li L., Zhang L., Zhao M., Yi H., Wang Z., Li G., Wang Z., Li M. (2023). Green extraction of phenolic compounds from lotus (*Nelumbo nucifera Gaertn*) leaf using deep eutectic solvents: process optimization and antioxidant activity. *Separations.* 2023. № 10. P. 272.
8. Pérez – Torrado R., Gamero E., Gómez – Pastor R., Garre E., Aranda A., Matallana, E. (2015). Yeast biomass, an optimized product with myriad applications in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* 2015. № 46. P. 167–175.

9. Khatun F., Kurata K., Chuwattanakul V., Sugiyama M., Kaneko Y., Harashima S. Increased transcription of RPL40A and RPL40B is important for the improvement of RNA production in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.* 2013. № 116(4). P. 423–432.
10. Chen H., Wang J., Li Q.; Xu X., Niu C., Zheng F., Liu C. Fed – Batch Fermentation of *Saccharomyces pastorianus* with High Ribonucleic Acid Yield. *Foods.* 2022. № 11. P. 2742.
11. Bzduhcha – Wróbel A., Blażejask S., Kawarska A., Stasiak – Róžańska L., Gientka I., Majewska E. Evaluation of the efficiency of different disruption methods on yeast cell wall preparation for β – glucan isolation. *Molecules.* 2014. № 19. P. 20941–20961.
12. Klis F. M., Boorsma A., De Groot P. W. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 2006. № 23. P. 185–202.

1.22 ОЦІНКА БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ПОТЕНЦІАЛУ ЕКСТРЕМОФІЛІВ: ВІД СКРИНІНГУ ПГА ДО МЕТОДІВ ЇХ ЕКСТРАКЦІЇ

Калініченко О. О., Юнгін О. С.

Київський національний університет технологій та дизайну, Україна
kalinichenko742135@gmail.com, olgaungin@gmail.com

Масштабне виробництво та утилізація нафтохімічних пластиків є однією з головних екологічних проблем сучасності, що спричиняє значні викиди парникових газів та забруднення довкілля через їхню стійкість до розкладу. Перспективною альтернативою є біополімери, зокрема полігідроксиалканоати (ПГА) — мікробні поліестери, що синтезуються багатьма прокаріотами як запасні речовини. ПГА є біорозкладними, біосумісними та мають широкий спектр фізико – хімічних властивостей, що робить їх ідеальними кандидатами для заміни традиційних полімерів.

Ключові слова: *Полігідроксиалкіаноати (ПГА), Антарктичні мікроорганізми, Психрофіли, Екстремофіли, Біополімери, екстракція, скринінг.*

Упродовж останніх десятиліть інтенсивне виробництво синтетичних полімерів перетворилося на одну з найактуальніших екологічних проблем сучасності. У 2022 році світовий обсяг виробництва пластику сягнув 390,7 млн тонн, з яких 90,2% отримано з викопного палива, тоді як лише 1,51% мали біологічне походження, а 8,32% були виготовлені з переробленої сировини. Виробництво та утилізація пластику суттєво впливають на стан довкілля: видобуток сировини – прекурсорів, транспортування, синтез полімерів і подальше управління відходами супроводжуються значними викидами парникових газів [1, 2]. Через низьку здатність пластику до переробки та той факт, що лише 13–15% від загального обсягу щорічного виробництва підлягає вторинній переробці, більшість полімерних відходів накопичується на сміттєзвалищах або потрапляє у морські екосистеми [3].

Одним із перспективних напрямів подолання цієї проблеми є використання біополімерів, здатних до біологічної деградації. Такі матеріали виготовляються з відновлюваних джерел, а процеси їх виробництва супроводжуються до 80% меншими викидами вуглекислого газу порівняно з традиційними нафтохімічними пластиками [4]. Біопластики можуть бути біорозкладними, наприклад полігідроксиалкіаноати (ПГА, PHA), пластмаси на основі полісахаридів, полімолочна кислота (ПМК, PLA), полібутилен адипат – ко – терефталат (ПБАК, ПБАТ) або полівініловий спирт (ПВС) [5], а також небіорозкладними – зокрема, біополіетилен (Віо – PE), біополіпропілен (Віо – PP), біополіетилентерефталат (Віо – PET) чи біополіетиленфураноат.

Важливим напрямом розвитку виробництва полігідроксиалканоатів є пошук нових продуцентів серед мікроорганізмів, особливо тих, що мешкають у екстремальних умовах. Значний науковий інтерес викликають антарктичні ізоляти, пристосовані до низьких температур, високого рівня ультрафіолетового випромінювання та дефіциту поживних речовин [6]. Завдяки своїм адаптивним механізмам вони здатні синтезувати полімери зі зміненою мономерною композицією, що потенційно розширює спектр функціональних властивостей ПГА [7]. Крім того, психрофільні бактерії можна культивувати при низьких температурах, що може сприяти зменшенню енергетичних витрат у виробничому процесі на певних етапах. Таким чином, дослідження біотехнологічного потенціалу антарктичних мікроорганізмів у контексті синтезу та потенціалу екстракції ПГА є актуальним напрямом сучасної науки, що поєднує фундаментальне значення для мікробіології екстремальних середовищ та прикладний інтерес біотехнологій.

Мета роботи – оцінити біотехнологічний потенціал антарктичних екстремофільних мікроорганізмів як продуцентів ПГА та проаналізувати сучасні методи скринінгу й екстракції цих полімерів.

Об'єкт дослідження – біосинтез ПГА мікроорганізмами та технологічні підходи до їхнього вилучення.

Предмет дослідження – біотехнологічний потенціал антарктичних екстремофільних мікроорганізмів для продукування ПГА, їхній мономерний склад, а також ефективність різних методів скринінгу та екстракції ПГА.

Полігідроксиалканоати (ПГА) як клас біополімерів

Полігідроксиалканоати (ПГА) належать до групи мікробних поліестерів, які синтезуються та накопичуються різними прокаріотичними мікроорганізмами – бактеріями та археями – як запасні речовини за умов надлишку джерел вуглецю та нестачі азоту чи фосфору. Ці полімери є водонерозчинними сполуками, що зберігаються у цитоплазмі клітин у вигляді гранул [8]. Завдяки своїй біорозкладності, біосумісності та різноманітності фізико – хімічних властивостей, ПГА розглядаються як перспективна альтернатива нафтохімічним пластикам.

Основна структура полігідроксиалканоатів — це аліфатичний поліестер, утворений із n (від 100 до 30 000) мономерних ланок, сполучених ефірними зв'язками (рис. 1).

Ключовою особливістю полігідроксиалканоатів (ПГА) є їхня структурна варіативність: залежно від довжини бічного ланцюга мономерів розрізняють коротколанцюгові (sc1 – PNA, C3–C5), середньоланцюгові (mc1 – PNA, C6–C14) та довголанцюгові полімери (lc1 – PNA, C > 14) [10].

Коротколанцюгові полігідроксиалканоати (sc1 – PNA), зокрема полі – 3 – гідроксибутират (PHB), характеризуються високою жорсткістю і міцністю. Водночас PHB має низку обмежень, серед яких низька швидкість обробки, крихкість і обмежена здатність до розтягування. Для

усунення цих недоліків застосовують синтез кополімерів із включенням мономерів, таких як 4 – гідроксибутират (4НВ), 3 – гідроксипропіонат (3НР) або 3 – гідроксивалерат (3НВ), що знижують рівень кристалічності, підвищують гнучкість і уповільнюють процес старіння матеріалу [11].

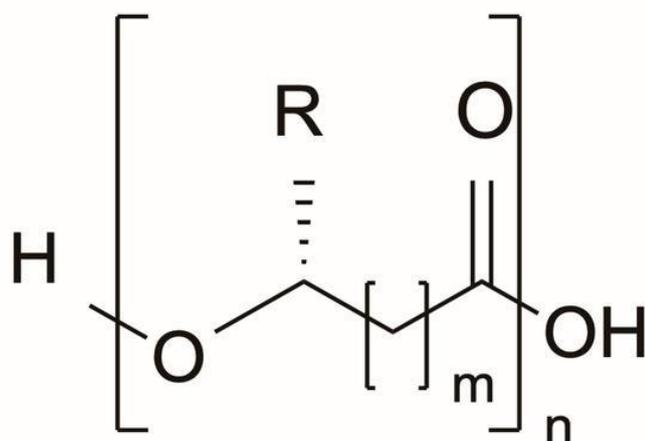


Рис. 1. Загальна хімічна структура полігідроксиалканоатів. «N» позначає кількість мономерів у полімерному ланцюзі, а «m» залежить від кількості атомів вуглецю в кожному мономері [9]

Середньоланцюгові полігідроксиалканоати (mcl – PHA) відзначаються нижчою міцністю на розрив, проте вищим видовженням і більшою еластичністю порівняно з scl – PHA. До цієї групи належать кополімери, що містять мономер, такі як 3 – гідроксигексаноат (3ННх) або 3 – гідроксооктаноат (3НО). Відомо, що показники міцності на розрив і видовження при розриві для найпоширеніших mcl – PHA становлять від 5 до 16,3 МПа та від 300% до 850% відповідно [12].

Довголанцюгові полігідроксиалканоати (lcl – PHA) є найменш досліджені [13].

Біосинтез ПГА здійснюється численними мікроорганізмами з ацетил – КоА у ході послідовності ферментативних реакцій за участю трьох основних ферментів: β – кетотілаза (phaA), що каталізує перетворення ацетил – КоА на ацетоацетил – КоА; ацетоацетил – КоА – редуктаза (phaB), що відновлює ацетоацетил – КоА до 3 – гідроксибутирил – КоА; і ПГА – полімераза (phaC), яка ініціює полімеризацію 3 – гідроксибутирил – КоА з утворенням полімеру ПГА. Для збереження ковалентного зв'язку з полімеразою ПГА формує амфіпатичні гранули всередині клітини [10].

Біотехнологічний потенціал та сфери застосування ПГА

Завдяки винятковій структурній варіабельності та біосинтетичному походженню полігідроксиалканоати (ПГА) вирізняються значним біотехнологічним потенціалом. Вони поєднують механічні властивості, співставні з нафтохімічними пластмасами, із повною біосумісністю та здатністю до розкладання в різних природних середовищах, таких як ґрунт, вода та компост. Таке поєднання характеристик робить ПГА перспективними кандидатами для заміни традиційних полімерів у ключових галузях, де екологічність і біорозкладність мають вирішальне значення.

Однією з таких галузей є медицина, де ПГА активно досліджують як біосумісні та біорозкладні матеріали для імплантатів, хірургічних шовних ниток, ранових покриттів і систем контрольованого вивільнення лікарських засобів. Гнучкі середньоланцюгові ПГА (mcl – PHA) можна пристосувати для відновлення м'яких тканин – наприклад, у вигляді серцевих латок, хрящів чи нервових провідників; тоді як жорсткіші коротколанцюгові аналоги (scl – PHA) ефективні в кісткових імплантатах завдяки високій міцності та контрольованій швидкості біодеградації. Показовим прикладом є полімер P(4HB), схвалений Управлінням продовольства та медикаментів США (FDA) під торговою маркою TerphaFLEX® – на його основі створені сучасні розсмоктувальні шовні матеріали (MonoMax®, Phantom Fiber™), які поєднують високу міцність, еластичність і біосумісність.

ПГА також впроваджують у перев'язувальні матеріали: зокрема, нанокомпозити на основі P(3HB – co – 4HB) з колагеном стимулюють ангиогенез і прискорюють загоєння рани до 98% порівняно з традиційними матеріалами. Крім того, завдяки контрольованій деградації, ПГА використовуються для створення мікро – та нанокапсульованих систем доставки медикаментів, що забезпечують пролонговане та цілеспрямоване вивільнення діючих речовин [10].

Іншою сферою використання є сільське господарство, у якому ПГА використовуються для виготовлення біорозкладних мульчувальних плівок. Такі плівки допомагають зберігати вологу в ґрунті, зменшують його ерозію та пригнічують ріст бур'янів і, на відміну від традиційних поліетиленових аналогів, не залишають пластикових відходів у довкіллі. Поєднання ПГА з іншими поліестерами, зокрема з полікапролактоном (ПКЛ), дозволяє отримати мульчувальні матеріали з покращеною гнучкістю, підвищеною стійкістю до механічних навантажень і контрольованою швидкістю біодеградації [14]. Крім того, ПГА застосовують у складі полімерних оболонок добрив з контрольованим вивільненням. Поступова деградація такої оболонки забезпечує рівномірне та довготривале постачання поживних речовин у ґрунт, завдяки чому підвищується ефективність живлення рослин і зменшуються втрати добрив. Використання ПГА в подібних системах мінімізує забруднення ґрунтів залишковими синтетичними матеріалами та підвищує екологічну стійкість агроценозів [15].

Продуценти ПГА

Полігідроксиалкіаноати (ПГА) продукуються широким спектром бактерій, як грампозитивних, так і грамнегативних. Традиційно для промислового виробництва ПГА використовують добре вивчені види, зокрема *Cupriavidus (Ralstonia) necator*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus megaterium*, *Azotobacter vinelandii* та інші [16]. Водночас сучасні дослідження дедалі більше зосереджуються на ізоляції мікроорганізмів із екстремальних екосистем — гарячих джерел, солончаків, глибоководних відкладів і полярних регіонів.

Екстремофільні мікроорганізми здатні рости та синтезувати різноманітні біотехнологічно цінні сполуки, зокрема полігідроксикарбонати, навіть за несприятливих умов довкілля. Це робить їх перспективними кандидатами для комерційного виробництва біопластику, оскільки використання екстремофілів може зменшити ризик контамінації, скоротити енергетичні витрати та знизити загальну собівартість процесу [17]. Наразі лише незначна кількість екстремофілів, зокрема археї (*Haloferax mediterranei*) та термофільні бактерії (*Clostridium* spp.), застосовується у виробництві біополімерів, тоді як більшість представників цієї групи використовуються переважно для отримання екстремозимів.

Останніми роками екстремофільні продуценти ПГА привертають дедалі більшу увагу дослідників, оскільки їхні унікальні фізіологічно – біохімічні властивості відкривають нові можливості для ефективного та стабільного біосинтезу полімерів навіть у суворих умовах навколишнього середовища [18]. Серед основних груп екстремофілів, здатних синтезувати ПГА, особливе значення мають галофіли — солетолерантні бактерії.

До галофільних продуцентів належать представники родів *Halomonas*, *Paracoccus*, *Salinivibrio* та галоархеї, зокрема *Haloferax mediterranei*, *Haloarcula marismortui*, *Haloquadratum* і *Halogeometricum*, які здатні накопичувати ПГА, зокрема кополімер полі(3 – гідроксибутират – ко – 3 – гідроксикарбонат) (PHBV), у вигляді гранул у клітинах [19]. Основною перевагою галофілів у виробництві ПГА є їх здатність рости в концентрованих соляних середовищах, що запобігає контамінації іншими мікроорганізмами та дозволяє проводити процес у нестерильних умовах. Наприклад, культивування *Halomonas* у солоному середовищі на основі морської води усуває потребу у стерилізації, а за умов гіпотонічного перемішування клітини автолізуються, що значно полегшує екстракцію ПГА [20].

Термофіли та термотолерантні бактерії

До цієї групи належать представники родів *Geobacillus*, *Cupriavidus*, *Caldimonas*, *Schlegelella* та інші, здатні рости за підвищених температур. Такі мікроорганізми становлять значний інтерес для промислової біотехнології, оскільки забезпечують високі виходи ПГА та стійкість процесу ферментації при температурах 50–60 °С, що знижує ризик контамінації та спрощує технологічні умови. Зокрема, термофільний штам *Geobacillus stearothermophilus* накопичував до 66 % сухої біомаси у вигляді ПГА, що представляв собою суміш полі(3 – гідроксибутирату), полі(3 – гідроксикарбонату) та полі(3 – гідроксигексанату) (PHB–PHV–PHX). Оптимізація умов культивування *Cupriavidus* sp. CB15, виділеного з компосту, дала змогу досягти ≈ 75 % накопичення PHB [21, 22]. Термотолерантний штам *Pseudomonas* sp. SG4502 (оптимальна температура росту — 45 °С) ефективно використовував гліцерин, отриманий з відходів виробництва біодизеля, накопичуючи до 40,6 % ПГА у клітинній біомасі [23].

Психрофіли

Бактерії з полярних регіонів здатні синтезувати ПГА при низьких температурах, що робить їх цінними продуцентами для енергоощадних технологій. Широкий скринінг психрофільних мікроорганізмів виявив значне різноманіття продуцентів ПГА серед представників родин *Comamonadaceae*, *Microbacteriaceae*, *Micrococcaceae* та інших. Наприклад, штами *Halomonas* sp. і *Paracoccus* sp., ізольовані з антарктичних морських льодів, накопичували ПГА навіть за температури 4 °С [18].

Деякі полярні штами, зокрема ендоефіти родів *Arthrobacter* та *Pseudomonas*, виділені з антарктичних рослин, здатні продукувати біополімери й активно рости в широкому діапазоні температур [24, 25]. Проведення низькотемпературних ферментацій не лише знижує енергетичні витрати на підігрів, але й мінімізує ризик контамінації, адже психрофіли не конкурують із мезофільною мікрофлорою.

Методи ідентифікації РНА – продуцентів

Традиційні підходи до ідентифікації бактерій, що накопичують полігідроксиалканоати (ПГА), ґрунтуються на використанні барвників, здатних забарвлювати внутрішньоклітинні ліпідні гранули. Зокрема, барвник Судан Чорний В забезпечує синьо – чорне забарвлення гранул ПГА, однак має низьку специфічність, оскільки взаємодіє також з іншими ліпідними включеннями [26]. Натомість флуоресцентні барвники Нільський синій А та Нільський червоний демонструють високу специфічність до ПГА і широко застосовуються для первинного скринінгу продуцентів. Під ультрафіолетовим освітленням Nile Red накопичується у гранулах ПГА, викликаючи характерне жовто – помаранчеве свічення, що дає змогу легко виявити позитивні клітини під мікроскопом [27]. Використання Nile Blue А безпосередньо на агарних чашках дозволяє оперативно ідентифікувати потенційних продуцентів: позитивні колонії світяться під УФ – освітленням, утворюючи чітко помітні флуоресцентні зони. Крім того, фазово – контрастна мікроскопія дає можливість спостерігати внутрішньоклітинні гранули ПГА без додаткового фарбування. Простий комбінований підхід – фарбування та мікроскопічний огляд – дає змогу швидко відсіяти численні культури за наявністю РНВ – гранул [26, 27].

Спектроскопічні методи

Фур'є – інфрачервона спектроскопія (FTIR) застосовується для швидкої перевірки хімічного складу ПГА. Характерний піковий сигнал карбонільної групи естерів ПГА спостерігається в діапазоні ~ 1720 cm^{-1} , що є індикатором наявності полімеру. Зсуви піків у спектрі FTIR дозволяють диференціювати гомо – та кополімери: наприклад, коротко – та середньоланцюгові ПГА демонструють $\text{C}=\text{O}$ – смуги при ~ 1732 – 1744 cm^{-1} . Метод потребує мінімальної підготовки зразка (зазвичай використовується висушена біомаса) і часто комбінується з іншими методами для уточнення складу полімеру [28].

ЯМР – спектроскопія

Методи ^1H – та ^{13}C – ЯМР забезпечують докладну інформацію про хімічну структуру мономерних одиниць ПГА. Кожен компонент (наприклад, 3 – гідроксибутират, інші гідроксиалканоати) має характерні хімічні зсуви у спектрах, що дозволяє точно ідентифікувати тип мономерів та визначити їх співвідношення. Хоча ЯМР – аналіз вимагає попереднього виділення полімеру та більшої кількості зразка, він забезпечує найвищу достовірність структурної ідентифікації. Так, у дослідженні *Pseudomonas phDVI* структура екстрагованого полімеру була підтверджена як РНВ за допомогою комбінації FTIR, ЯМР та MALDI – TOF – аналізу [29].

Газова хроматографія з мас – спектрометрією (GC–MS)

Після метанолізу полімеру GC–MS дозволяє визначити типи та частки мономерів у складі ПГА. Метод забезпечує кількісний аналіз за допомогою порівняння мас – спектрів з бібліотечними базами, що дає змогу ідентифікувати навіть рідкісні мономерні. Зокрема, GC–MS було використано для аналізу ПГА, накопиченого *Pseudomonas*, де виявлено середньоланцюгові 3 – гідроксиалканоати (3 – ГДО, 3 – ГДД тощо). Цей метод характеризується високою чутливістю і точністю, особливо при дослідженні кополімерів [30].

Термогравіметричний аналіз (TGA)

TGA застосовується для оцінювання термічної стабільності та чистоти ПГА. Чистий полімер РНВ деградує при температурі $\sim 260\text{--}280\text{ }^\circ\text{C}$, тоді як наявність домішок (білків, полісахаридів) знижує температуру розкладання до $220\text{--}260\text{ }^\circ\text{C}$. Наприклад, ПГА, отриманий шляхом кип'ятіння або обробки концентрованим NaOH, демонстрував деградацію при нижчих температурах, тоді як зразки, очищені SDS або NaClO, залишалися стабільними до $300\text{ }^\circ\text{C}$. Аналіз залишкової маси після деградації також свідчить про ступінь очищення: чисті полімери залишають мінімальний осад [1].

Матрично – активована лазерна десорбція/іонізація (MALDI – TOF MS)

Цей метод використовується для визначення молекулярної маси ПГА та структури олігомерів. Наприклад, для РНВ у спектрі спостерігається іон $[\text{MH}^+]$ з $m/z = 86$, що відповідає мономеру 3 – гідроксибутирату. MALDI – TOF дозволяє швидко аналізувати кінцеві групи та визначити наявність коротких олігомерів чи теломерів. Хоча метод менш чутливий до слідів домішок, ніж GC–MS, він забезпечує цінну інформацію про молекулярну структуру та розподіл мас полімерів ПГА.

Комбіноване застосування методів

Для достовірного підтвердження синтезу ПГА зазвичай використовують комбінацію декількох аналітичних підходів. FTIR та ЯМР визначають типи хімічних зв'язків і загальну структуру полімеру, GC–MS забезпечує кількісний аналіз мономерного складу, флуоресцентні методи (Nile Red) та TGA оцінюють кількість і чистоту полімера, а MALDI – TOF чи GPC характеризують його молекулярно – масові параметри [1,29].

Для ізолятів із полярних регіонів застосування таких комбінацій має особливе значення, адже екстремофіли часто синтезують нетипові ПГА з рідкісними мономерами, що потребує підтвердження кількома незалежними методами.

Методи екстракції РНА з мікробної біомаси

Комплексний аналіз мономерного складу та структурних характеристик полігідроксиалканоатів (ПГА) є основою для вибору оптимальної стратегії їх вилучення. Саме від методів екстракції залежить кількість та збереження фізико – хімічних властивостей полімеру. Нижче розглянуто основні підходи до виділення ПГА з мікробної біомаси.

Органічні розчинники

Найпоширенішим підходом є екстракція ПГА за допомогою органічних розчинників. Традиційно застосовують аполярні галогеновмісні розчинники на кшталт хлороформу або дихлорметану, які здатні розчинити внутрішньоклітинні гранули ПГА і ефективно відділяти полімер від клітинних залишків. Даний метод забезпечує високий вихід полімеру – для полі(3 – гідроксибутирату) (ПГБ). повідомлялося про вилучення до ~95% накопиченого полімеру [1, 30]. Більш безпечною альтернативою хлороформу, виступає диметилкарбонат, який забезпечує ~ 67 % вихід ПГБ [31]. Важливо, що органічні розчинники не викликають хімічної деградації ПГА, дозволяючи зберегти молекулярну масу полімеру. Недоліки цього підходу пов'язані з токсичністю та екологічною небезпекою галогеновмісних розчинників, а також складнощами їхньої регенерації. Хлороформ і подібні розчинники є леткими, горючими та шкідливими для здоров'я, що ускладнює їх промислове використання і потребує пошуку безпечніших альтернатив.

«Зелені» методи

Серед сучасних «зелених» органічних розчинників, що застосовуються для екстракції полігідроксиалканоатів (ПГА), особливу увагу приділяють біорозкладним естерам і кетонам, які характеризуються низькою токсичністю та екологічною безпечністю. Зокрема, ефективними виявилися розчинники на основі гліцерину та етилацетату, які забезпечують високу селективність вилучення полімеру без суттєвого зниження його молекулярної маси. Значного поширення набув 2 – метилтетрагідрофуран (2 – MeTHF), екстракція з використанням якого показала високу ефективність навіть без попереднього окиснювального оброблення натрій гіпохлоритом (NaClO) [30]. Як встановлено, застосування 2 – MeTHF забезпечує вихід полімеру близько 78 % при чистоті зразка до 93 %, що перевищує показники, отримані при використанні традиційного хлороформу. Іншим перспективним «зеленим» розчинником є диметилкарбонат (DMC), який вирізняється нетоксичністю, повною біорозкладністю та безпечністю для оператора. Екстракція полі(3 – гідроксибутирату) (PHB) за допомогою DMC демонструє виходи на рівні 67–80 %, що є співставним із результатами хлороформних методів, проте з істотно меншим впливом на здоров'я людини та навколишнє середовище [31].

Хімічні методи екстракції ПГА

Хімічні методи базуються на руйнуванні клітинних структур за допомогою реактивів з метою вивільнення та очищення гранул ПГА. Зазвичай використовують або сильні окисники, або лужні реагенти для лізису біомаси.

Окислювальні методи

Одним із найпростіших та найдешевших способів виділення ПГА є обробка біомаси сильними окисниками – зокрема, розчином гіпохлориту натрію (NaClO). Гіпохлорит ефективно розкладає білки, ліпіди та інші біомолекули клітини, залишаючи практично чистий полімерний осад. Таким чином вдається отримати ПГА дуже високої чистоти (до 95–99%). Однак головним недоліком методу є те, що агресивний окисник суттєво пошкоджує сам полімер. Гіпохлорит викликає деполімеризацію ланцюгів ПГА – молекулярна маса різко знижується, погіршуючи механічні властивості матеріалу. Дослідження показали, що після обробки NaClO вихід інтактного полімеру становить менше ніж 10 %, навіть якщо ступінь руйнування біомаси сягає 80 %.

Щоб мінімізації деградації, гіпохлоритну обробку часто комбінують із екстракцією органічними розчинниками, що дає змогу зберегти структуру полімеру і водночас забезпечити високу чистоту продукту [32]. Так, попередня обробка біомаси розчином NaClO перед екстракцією ДМК вуглекислим газом або осадженням ПГА з алкоголю підвищує вихід полімеру (до ~90+ %) та його чистоту (~98–99%), проте навіть при цьому молекулярна маса може знижуватися у 4–5 разів [34].

Лужна екстракція

Лужні реагенти (гідроксиди натрію чи калію) діють м'якше на полімер, викликаючи омилення ліпідів клітинної мембрани і руйнування клітинної стінки без прямого окиснення ПГА. Це сприяє вивільненню гранул полімеру з мінімальним пошкодженням їх структури. При використанні низьких концентрацій лугу (0,01–0,05 М) досягається вихід ПГА на рівні 50–80 %.

Оптимальні умови, за яких забезпечується високий ступінь очищення без деградації полімеру, становлять приблизно 0,05 М NaOH, температура 60 °С і тривалість обробки 1 годину. Підвищення концентрації лугу або температури призводить до розщеплення полімерних ланцюгів, що знижує молекулярну масу та погіршує механічні властивості кінцевого продукту. Так, наприклад, занадто концентрований розчин NaOH призводить до гідролізу поліефірних зв'язків і погіршує міцність матеріалу. Основні переваги лужної екстракції полягають у її низькій вартості, простоті виконання та придатності для масштабування, оскільки NaOH є доступним і безпечним промисловим реагентом. Недоліки — потреба у нейтралізації, багаторазовому промиванні продукту, а також ризик часткової деградації полімеру при порушенні режиму обробки [1].

Детергенти

Ще одним підходом до екстракції ПГА є використання поверхнево – активних речовин (детергентів). Аніонні поверхнево – активні речовини, зокрема натрій додецилсульфат, широко використовуються для деструкції клітинних оболонок у процесі вилучення полігідроксиалканоатів (ПГА). Механізм дії натрій додецилсульфату полягає у розчиненні білково – ліпідного шару мембрани, що призводить до вивільнення внутрішньоклітинних гранул ПГА. Лізис клітин за допомогою натрію додецилсульфату відзначається відносною простотою виконання, помірним виходом полімеру (приблизно 60 % від накопиченої кількості ПГА) та збереженням його молекулярної маси, оскільки детергент не спричиняє деградації полімерних ланцюгів [35]. Ефективність даного підходу може варіювати залежно від типу клітинної стінки мікроорганізму, тому його часто поєднують з іншими методами, такими як лужна або ферментативна обробка, з метою підвищення ступеня очищення кінцевого продукту. Основними перевагами цього методу є його безпечність і доступність, тоді як до недоліків належать необхідність ретельного видалення залишків детергенту зі зразка та порівняно невисокий вихід полімеру [1].

Фізичні методи

До фізичних методів вилучення ПГА належать різні способи механічного руйнування клітин. Один із поширених прийомів – ультразвукова обробка. Такий підхід часто використовується як етап попередньої обробки перед екстракцією органічними розчинниками або лужними реагентами. Ультразвук руйнує клітинні стінки і мембрани, вивільняючи гранули ПГА. Проте, використання фізичних методів дає обмежений результат через фрагментацію ланцюгів і зниження молекулярної маси ПГА. Альтернативою є гомогенізація високим тиском, за якої клітинна суспензія проходить через вузький отвір під великим тиском, що створює значні градієнти швидкості і розриває клітини.. Цей метод ефективний для масштабних процесів, хоча потребує спеціалізованого обладнання [32]. Як і у випадку з ультразвуком, надмірні режими обробки можуть частково пошкоджувати структуру полімеру. Тому фізичні методи найчастіше використовуються як додатковий етап обробки.

Використання ензимів

Ферментативна екстракція ПГА вважається одним із найбільш точних та щадливих методів, які розщеплюють компоненти клітинної стінки та мембран, не зачіпаючи при цьому сам полімер. Ферментативні методи екстракції передбачають використання гідролітичних ферментів, таких як протеази, нуклеази чи лігази, для вибіркового руйнування білкових та нуклеїнових компонентів клітинної стінки без пошкодження гранул ПГА. Наприклад, комбінація протеаз (зокрема алкалази), хелатного агента EDTA та низькою концентрацією додецилсульфату натрію дозволяє досягти високого ступеня очищення середньоланцюгових полігідроксиалканоатів. Хоча ферментативна екстракція і забезпечує

отримання полімеру високої чистоти зі збереженням його структурних характеристик, суттєвими недоліками є висока вартість промислових ферментів, значна тривалість процесу та складністю масштабування через необхідність підтримання активності ферментів і подальшого видалення білкових залишків із зразка [33].

Висновки. Полігідроксиалканоати (ПГА) є одним із найперспективніших класів мікробних полімерів завдяки поєднанню біосумісності, повної біорозкладності та можливості регулювання фізико – хімічних властивостей через варіації мономерного складу. ПГА демонструють значний потенціал як екологічна альтернатива нафтохімічним пластикам, особливо в біомедичних і агротехнологічних застосуваннях, де безпечність та контрольована деградація мають вирішальне значення.

Екстремофільні мікроорганізми, зокрема антарктичні психрофіли, становлять цінне джерело нових продуцентів ПГА. Їхні ферментативні системи здатні синтезувати полімери зі зміненою мономерною композицією при низьких температурах, що може суттєво знизити енергетичні витрати виробництва. Це робить їх перспективними об'єктами для біотехнологічного використання у процесах, орієнтованих на принципи сталого розвитку.

Незважаючи на високий потенціал, основним стримуючим фактором для масового впровадження ПГА залишається їхня висока собівартість порівняно з нафтохімічними аналогами. Зменшення виробничих витрат є ключовою проблемою, яку намагаються вирішити шляхом пошуку дешевої сировини (відходи, побічні продукти) та оптимізації процесів ферментації.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Getino L., García I., Cornejo A., Mateos R., Ariza – Carmona L. M., Sánchez – Castro N., Moran J. F., Olivera E. R., Chamizo – Ampudia A. The Effectiveness of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Extraction Methods in Gram – Negative *Pseudomonas putida* U. Polymers. 2025. № 17(2). P. 150.
2. Sharma S., Sharma V., Chatterjee S. Contribution of plastic and microplastic to global climate change and their conjoining impacts on the environment—A review. Sci. Total Environ. 2023. № 875. P. 162627.
3. Chien Bong C. P., Alam M. N. H. Z., Samsudin S. A., Jamaluddin J., Adrus N., Mohd Yusof A. H., Muis Z. A., Hashim H., Salleh M. M., Abdullah A. R. *et al.* A review on the potential of polyhydroxyalkanoates production from oil – based substrates. J. Environ. Manag. 2021. № 298. P. 113461.
4. Mangal M., Rao C. V., Banerjee T. Bioplastic: An eco – friendly alternative to non – biodegradable plastic. Polym. Int. 2023. № 72. P. 984–996.
5. Rosenboom J. – G., Langer R., Traverso G. Bioplastics for a circular economy. Nature Reviews Materials. 2022. № 7. P. 117–137.
6. D'Amico S., Collins T., Marx J. – C., Feller G., Gerday C. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. EMBO Rep. 2006. № 7(4). P. 385–389.
7. Obulisamy P. K., Mehariya S. Polyhydroxyalkanoates from extremophiles: A review. Bioresour. Technol. 2021. № 325. P. 124653.
8. Cánovas V., García – Chumillas S., Monzó F., Simó – Cabrera L., Fernández – Ayuso C., Pire C., Martínez – Espinosa R. M. Analysis of Polyhydroxyalkanoates Granules in

Haloferax mediterranei by Double – Fluorescence Staining with Nile Red and SYBR Green by Confocal Fluorescence Microscopy. *Polymers*. 2021. № 13(10). P. 1582.

9. Sharma V., Sehgal R., Gupta R. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Properties and Modifications. *Polymer*. 2021. № 212. P. 123161.

10. Ben Abdeladhim R., Reis J. A., Vieira A. M., Dias de Almeida C. Polyhydroxyalkanoates: Medical Applications and Potential for Use in Dentistry. *Materials*. 2024. № 17(22). P. 5415.

11. Singh A. K., Srivastava J. K., Chandel A. K., Sharma L., Mallick N., Singh S. P. Biomedical applications of microbially engineered polyhydroxyalkanoates: An insight into recent advances, bottlenecks, and solutions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019. № 103. P. 2007–2032.

12. Guo W., Yang K., Qin X., Luo R., Wang H., Huang R. Polyhydroxyalkanoates in tissue repair and regeneration. *Eng. Regen.* 2022. № 3. P. 24–40.

13. Rodriguez – Contreras A. Recent Advances in the Use of Polyhydroxyalkanoates in Biomedicine. *Bioengineering*. 2019. № 6(3). P. 82.

14. Othman N. A. F., Selambakkannu S., Seko N. Biodegradable dual – layer Polyhydroxyalkanoate (pha)/Polycaprolactone (pcl) mulch film for agriculture: Preparation and characterization. *Energy Nexus*. 2022. № 8. P. 100137.

15. Majeed, Zahid, Ramli, Nur Kamila, Mansor, Nurlidia and Man, Zakaria. «A comprehensive review on biodegradable polymers and their blends used in controlled – release fertilizer processes» *Reviews in Chemical Engineering*, vol. 31, no. 1, 2015, pp. 69 – 95.

16. Vicente D., Proença D. N., Morais P. V. The Role of Bacterial Polyhydroxyalkanoate (PHA) in a Sustainable Future: A Review on the Biological Diversity. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2023. № 20(4). P. 2959.

17. Obulisamy P. K., Mehariya S. Polyhydroxyalkanoates from extremophiles: A review. *Bioresour. Technol.* 2021. № 325. P. 124653.

18. Możejko – Ciesielska J., Ray S., Sankhyan S. Recent Challenges and Trends of Polyhydroxyalkanoate Production by Extremophilic Bacteria Using Renewable Feedstocks. *Polymers*. 2023.

19. Hammami K., Souissi Y., Souii A., Ouertani A., El – Hidri D., Jabberi M., Chouchane H., Mosbah A., Masmoudi A. S., Cherif A., Neifar M. Extremophilic Bacterium *Halomonas desertis* G11 as a Cell Factory for Poly – 3 – Hydroxybutyrate – co – 3 – Hydroxyvalerate Copolymer's Production. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022. № 10. P. 878843.

20. Chen G. – Q., Jiang X. – R. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2018. № 50. P. 94–100

21. Doi Y., Kawaguchi Y., Nakamura Y., Kunioka M. Nuclear magnetic resonance studies of poly(3 – Hydroxybutyrate) and polyphosphate metabolism in *Alcaligenes eutrophus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1989. № 55. P. 2932–2938.

22. Houfani A. A., Basen M., Olson D. G., Blumer – Schuette S. E. Editorial: extremophiles in lignocellulose degradation. *Front. Microbiol.* 2022. № 13. P. 915291

23. Hammami K., Souissi Y., Souii A., Ouertani A., El – Hidri D., Jabberi M., Chouchane H., Mosbah A., Masmoudi A. S., Cherif A., Neifar M. Extremophilic Bacterium *Halomonas desertis* G11 as a Cell Factory for Poly – 3 – Hydroxybutyrate – co – 3 – Hydroxyvalerate Copolymer's Production. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022. № 10. P. 878843.4

24. Iungin O., Prekrasna – Kviatkovska Y., Kalinichenko O., et al. Antifungal activity of endophytic bacteria associated with Antarctic vascular plants. *ICAMS 2024 Proceedings*. 2024.

25. Iungin O., Prekrasna – Kviatkovska Y., Kalinichenko O., et al. Biocontrol potential of Antarctic endophytic bacteria. *Ukrainian Antarctic Journal*. 2025;22(2):219–228.

26. Samrot A. V., Samanvitha S. K., Shobana N., Renitta E. R., Senthilkumar P., Kumar S. S., Abirami S., Dhiva S., Bavanilatha M., Prakash P., Saigeetha S., Shree K. S., Thirumurugan R. The Synthesis, Characterization and Applications of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) and PHA – Based Nanoparticles. *Polymers (Basel)*. 2021. № 13(19). P. 3302.

27. Sachan R. S. K., Kumar A., Karnwal A. *et al.* Screening and characterization of PHA producing bacteria from sewage water identifying *Bacillus paranthracis* RSKS – 3 for bioplastic production. *BMC Microbiol.* 2025. № 25. P. 136.
28. Samrot A. V., Samanvitha S. K., Shobana N., Renitta E. R., Senthilkumar P., Kumar S. S., Abirami S., Dhiva S., Bavanilatha M., Prakash P., Saigeetha S., Shree K. S., Thirumurugan R. The Synthesis, Characterization and Applications of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) and PHA – Based Nanoparticles. *Polymers (Basel)*. 2021. № 13(19). P. 3302.4
29. Kanavaki I., Drakonaki A., Geladas E. D., Spyros A., Xie H., Tsiotis G. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production in *Pseudomonas* sp. pHDV1 Strain Grown on Phenol as Carbon Sources. *Microorganisms*. 2021. № 9(8). P. 1636.
30. Rizzo C., Amata S., Palumbo Piccionello A., Mineo A., Mannina G. An environmentally sustainable extraction protocol for polyhydroxyalkanoates from mixed culture biomass. *J. Environ. Chem. Eng.* 2025. № 13(5). P. 117691
31. Mongili B., Abdel Azim A., Fraterrigo Garofalo S. *et al.* Novel insights in dimethyl carbonate – based extraction of polyhydroxybutyrate (PHB). *Biotechnol. Biofuels*. 2021. № 14. P. 13.
32. Getino L., Martín J. L., Chamizo – Ampudia A. A Review of Polyhydroxyalkanoates: Characterization, Production, and Application from Waste. *Microorganisms*. 2024. № 12(10). P. 2028.
33. Kapritchkoff F. M., Viotti A. P., Alli R. C. P., Zuccolo M., Pradella J. G. C., Maiorano A. E., Miranda E. A., Bonomi A. Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*. *J. Biotechnol.* 2006. № 122. P. 453–462.
34. Pagliano G., Galletti P., Samorì C., Zaghini A., Torri C. Recovery of Polyhydroxyalkanoates From Single and Mixed Microbial Cultures: A Review // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2021. – Vol. 9. – Article 624021. – DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.624021>.
35. Pagliano G., Galletti P., Samorì C., Zaghini A., Torri C. Recovery of Polyhydroxyalkanoates From Single and Mixed Microbial Cultures: A Review // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2021. – Vol. 9. – Article 624021.

1.23 ОСОБЛИВОСТІ ПРОЦЕСІВ ВІДМИВКИ БАКТЕРІАЛЬНИХ КЛІТИН ТА ТІЛЕЦЬ ВКЛЮЧЕННЯ В РЕКОМБІНАТНИХ БІОТЕХНОЛОГІЯХ

Хейломський Д.О., Майстренко Л.А., Мокроусова О.Р.

Київський національний університет технологій та дизайну
mokrousova.or@knutd.edu.ua

Процеси відмивки бактеріальних клітин штаму генно-модифікованого штаму-продуценту рекомбінантного інсуліну людини на основі *Escherichia coli* BL21 від компонентів культурального середовища, а також відмивки виділених в результаті руйнування зазначених бактеріальних клітин тілець включення (ТВ) від компонентів цитоплазми та клітинного дебрису, значною мірою визначають технологічність, вихід та якість очищення цільового продукту на наступних етапах даунстрім-процесу біотехнологічного виробництва рекомбінантного інсуліну людини. Зокрема, особливості роботи відцентрового сепаратора в процесі відмивки бактеріальних клітин штаму-продуценту від компонентів культурального середовища, відмивки ТВ, виділених в результаті руйнування зазначених бактеріальних клітин, є важливими з огляду на підвищення якості відмивки, зменшення втрат цільового продукту та покращення технологічності проведення наступної стадії даунстрім-процесу (розчинення ТВ).

Враховуючи, що розділення є важливим завданням [1-5] в біотехнології, це може бути дуже складно здійснити на практиці через низьку концентрацію присутнього білка і великий об'єм рідини, з якою потрібно працювати, крихкість клітин, наявність клітинних залишків, дрібних частинок і колоїдів, а також високу в'язкість через розчинення внутрішньоклітинних речовин, таких як РНК. Як правило, розділення можна досягти за допомогою фільтрації та седиментації. Існують певні специфічні проблеми, пов'язані з кожним з цих методів.

На рис. 1 показано використання центрифугування в біофармацевтичному виробництві терапевтичного білка з використанням клітин ссавців, бактерій і дріжджів, які зазвичай застосовуються. Центрифугування використовують для розділення, очищення/полірування, згущення, промивання та розділення.

Відповідно до послідовності, представленій на рис. 1 (зліва), після вилучення з біореактора суспензію клітинної культури, що містить клітини ссавців, направляють на центрифугу, де клітини відокремлюють від рідкого продукту, який містить позаклітинний білок, що виділяється з клітин ссавців. Відокремлену рідину направляють на глибинний фільтр для подальшого очищення, видаляючи будь-які тверді частинки перед тим, як відправити її на подальшу переробку.

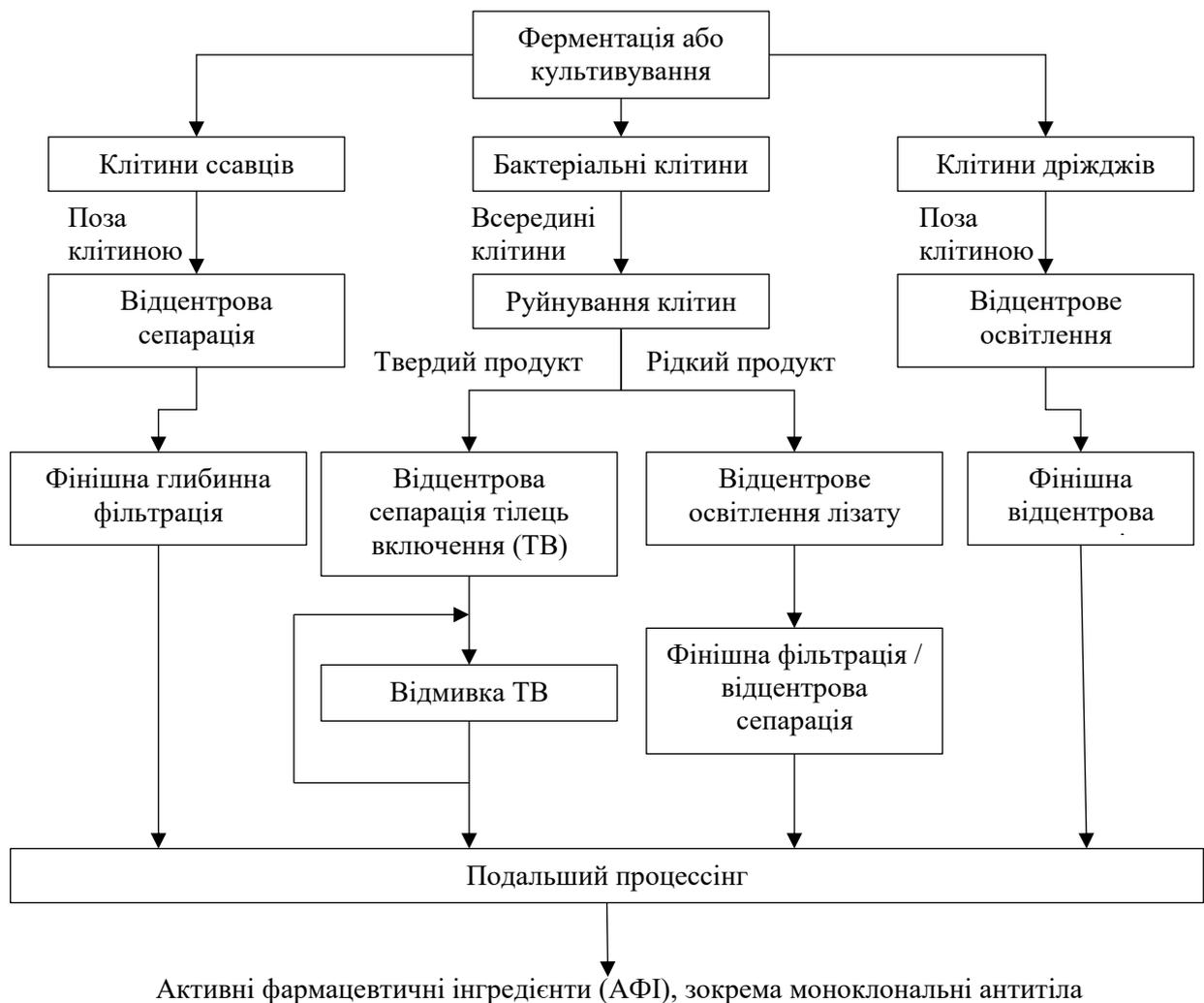


Рис. 1. Послідовність отримання лікарських речовин шляхом ферментації, процесів виділення та очищення з використанням сепарації центрифугуванням

Відповідно до стадії біопроцесу на рис. 1 (середня складова), білок експресується внутрішньоклітинно в бактеріях. Після збору та гомогенізації білок вивільняється з лізованих бактерій у тільцях включення, які необхідно виділити перед подальшою обробкою.

Центрифугування використовується для осадження тілець включення, у той час як клітинний вміст, клітинні уламки та дрібніші матеріали залишаються разом із рідкою фазою для знищення. Тіло включення додатково промивають і відокремлюють кілька разів, поки воно не досягне бажаної чистоти для подальшої обробки. Альтернативно, білок з бактерій може бути експресований у внутрішньоклітинній рідині, і після гомогенізації цей білок вивільняється в рідину. На даному етапі завдання полягає у видаленні всіх твердих речовин і відновленні рідини, що містить розчинний білок. Біомасу доведеться промити, щоб переконатися, що білок не прилипає до поверхні біомаси, інакше це означає втрату або менший вихід для процесу.

З огляду на біопроект на рис. 1 (справа), після збирання з ферментера суспензію дріжджів направляють на центрифугування, де рідина, що містить позаклітинний білок, відокремлюється від твердих речовин дріжджів. Рідину, що виходить із центрифуги часто доводиться знову центрифугувати (тобто освітлення або полірування), щоб видалити будь-які частинки та каламутність перед подальшою обробкою.

Вищевказані три шляхи є центральними для біофармацевтичного виробництва терапевтичних білків з використанням клітин-господарів, на чому ґрунтуються рекомбінантні біотехнології сьогодні.

Відцентрова сепарація широко використовується в біотехнологіях. Промислову відцентрову сепарацію [6, 7] можна загалом розділити на два класи: осадження та фільтрування. Слід зазначити, що звичайне центрифугування може відокремлювати лише зважені тверді речовини, а не розчинені тверді речовини, за винятком відцентрового фільтра, який буде розглянуто пізніше, який може відокремлювати розчинні тверді речовини. Важчі тверді речовини осідають на твердій стінці седиментаційної центрифуги під дією відцентрового прискорення, яке значно перевищує силу тяжіння. Для розділення необхідна різниця густини між твердою та рідкою фазами. Схема седиментаційної центрифуги з суцільною стінкою показана на рис. 2.

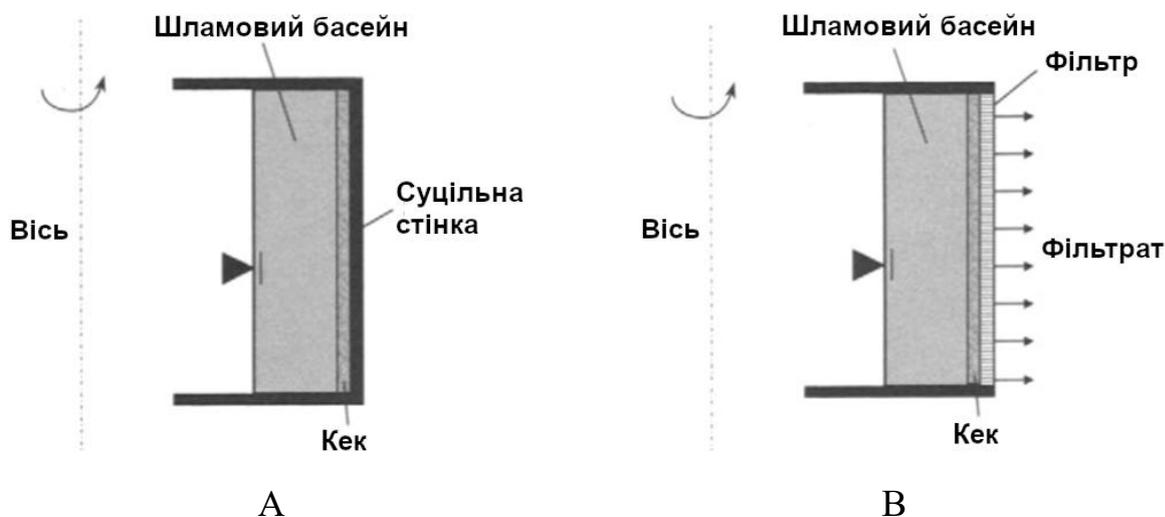


Рис. 2. Конструкційні особливості седиментаційної та фільтрувальної центрифуг:
А) Седиментаційна центрифуга з суцільною стінкою; Обертання барабана із суспензією навколо осі призводить до відкладення твердої фази на суцільній поверхні осадження.
В) Фільтрувальна центрифуга з перфорованою стінкою; Обертання барабана із суспензією навколо осі призводить до проходження фільтрату крізь проникну поверхню фільтрації та до відкладення твердої фази на ній [8]

Подібним чином, більш легка дисперсна тверда фаза, як жир або тверді речовини з прикріпленими бульбашками повітря, також може плавати (замість того, щоб тонути) у безперервній рідкій фазі, а розділення шляхом флотації може бути посилене у відцентровому полі. З іншого боку, різниця щільності між двома фазами не потрібна для відділення твердої

фази від рідкої у фільтрувальній центрифугі. Обидві фази розподіляються під дією відцентрової сили на перфорованій стінці, покритої фільтруючим середовищем. Рідина проникає (рис. 2) через фільтруюче середовище, тоді як тверді речовини, розмір яких порівняний або більший за отвори фільтруючого середовища, затримуються. Іноді навіть більш дрібні тверді речовини можуть затримуватися, оскільки вони «перекривають» або «забивають» середні отвори, не даючи їм пройти через фільтр. Таким чином, отвори у фільтруючому середовищі можуть бути зазвичай у два-три рази більші за розмір частинок, які потрібно утримати. Після того, як на середовищі утворюється шар «кека» з частинок, незважаючи на деякі дрібніші частинки, які все ще можуть просочуватися крізь нього під час початкової фільтрації, шар кека надалі діє як інше фільтруюче середовище послідовно з вихідним середовищем для утримання вхідних частинок. Можна побачити, що фільтруючі центрифуги можуть розділяти частинки та рідину незалежно від різниці їх густини; це дуже сильно відрізняється від седиментаційної центрифуги, яка покладається на різницю густини двох фаз для розділення.

Таким чином, вибір між седиментаційною та фільтрувальною конструкцією відцентрового сепаратора залежить від технологічного завдання (збір фугата або ретентата), фізико-хімічних властивостей розділюваної суміші, а також від технічних вимог до виробничого обладнання і процесу.

Седиментаційні центрифуги можуть бути класифіковані насамперед за ознакою періодичного або безперервного розвантаження, як показано на рис. 3. Подальша класифікація враховує головні конструктивні особливості. Так, відцентровий седиментаційний сепаратор періодичного розвантаження може характеризуватися періодичною або безперервною подачею суспензії. Звичайні центрифуги для пробірок, ультрацентрифуги та зональні центрифуги можна вважати сепараторами з періодичною подачею суспензії і періодичним вивантаженням, хоча деякі зональні центрифуги мають можливість безперервної подачі і розвантаження.

Трубчасті, ручні дискові, камерні, багаточашкові сепаратори і сепаратори із суцільним кошиком розглядають як напівбезперервні, оскільки вони працюють із безперервною подачею суспензії. Важчі та твердіші компоненти суспензії осідають під дією відцентрового прискорення, а осад тимчасово зберігається в чаші, доки прозорість відокремленої рідини не погіршиться під впливом накопичення осаду в чаші. У цей момент подача припиняється, сепаратор зупиняється, рідина зливається, а осад видаляється. Сепаратор необхідно очистити перед наступним циклом.

Дискові та декантерні відцентрові сепаратори належать до категорії обладнання з безперервним або напівбезперервним вивантаженням осаду. Дискові центрифуги бувають двох типів залежно від того, як виводяться концентровані тверді компоненти: з відкидним дном і періодичним вивантаженням твердих компонентів, а також із форсунковим диском і

постійним вивантаженням твердих компонентів. З іншого боку, існує чотири типи декантерів: звичайний декантер, декантер із подвійним конусом для розділення двох твердих і рідкої фаз, декантер із складним профілем для зневоднення дрібних твердих фаз із отриманням пастоподібного концентрату, а також форсунковий декантер для відділення суспензії каоліну із розміром частинок 1-2 мкм.

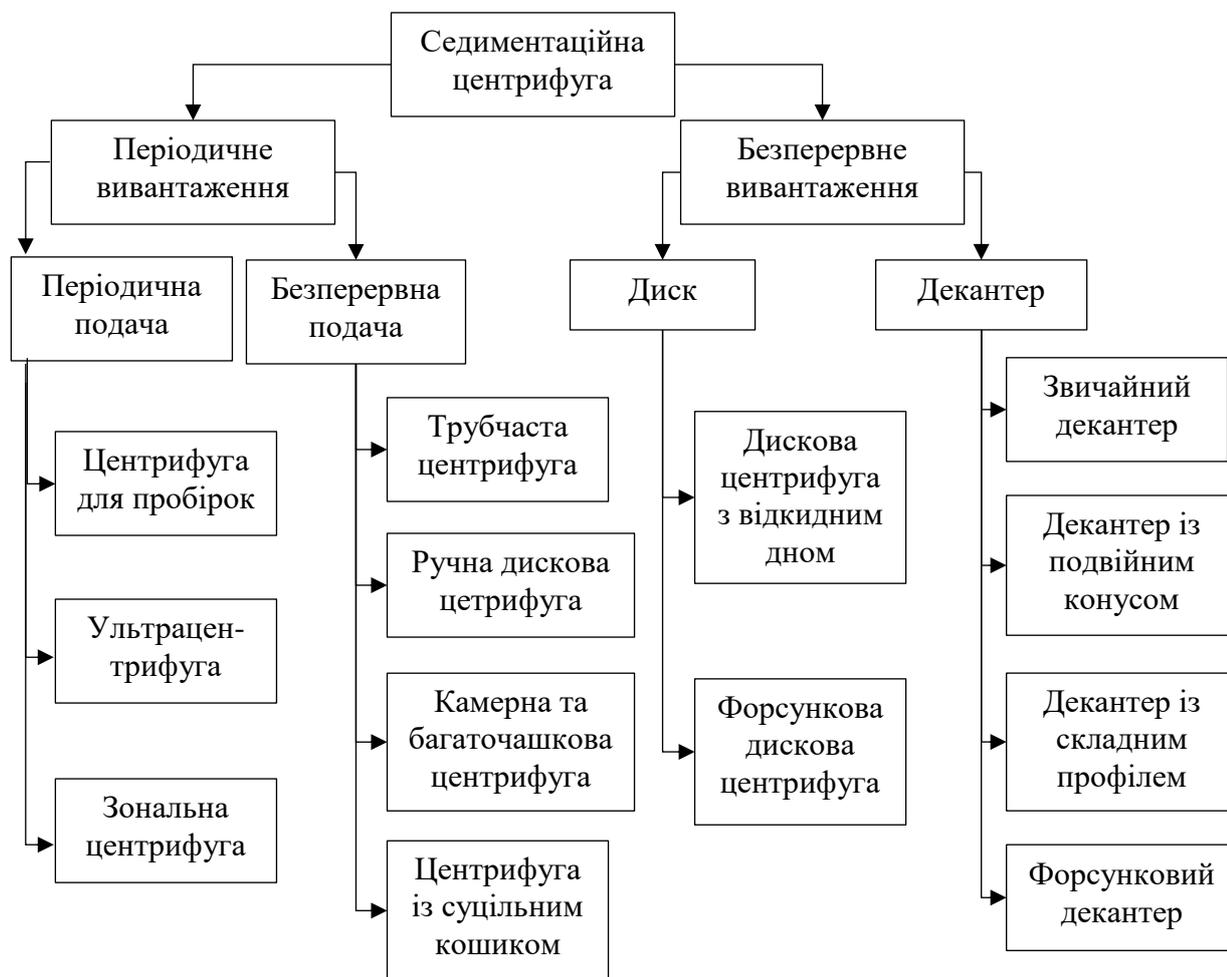


Рис. 3. Класифікація відцентрових сепараторів за ознаками, зокрема, періодичного або безперервного розвантаження

Фільтрувальні центрифуги так само можуть бути класифіковані насамперед за ознакою періодичної або безперервної дії (рис. 4). Так само, їх подальша класифікація враховує головні конструктивні особливості. Так, відцентрові фільтраційні сепаратори періодичного розвантаження можуть бути віднесені до двох категорій. Перша, з дрібносерійною подачею суспензії, охоплює фільтрувальні центрифуги з перфорованою трубкою, що обертається, та кошиком, а також відцентрові фільтри. Під другу, з крупносерійною подачею суспензії, потрапляють звичайні кошикові ротори, відцентрові очисники, сифонні центрифуги та центрифуги з мішками, що перевертаються.



Рис. 4 . Класифікація фільтрувальних відцентрових сепараторів за ознаками, зокрема, періодичної або безперервної дії

Відцентровий пушер, конічний ситовий сепаратор та відцентровий грохот є центрифугами безперервної дії. Суспензія безперервно подається в ці центрифуги, а компактний кек осаду, утриманого фільтрувальним середовищем, безперервно вивантажується. Рідкий фільтрат з мінімальною кількістю суспендованих речовин також видаляється окремо.

Суспензія, що містить тверді біологічні речовини, фільтрується дуже повільно, і вони часто закупорюють фільтр, утворюючи непроникний осад. Як наслідок, на фільтрацію часто впливає фільтрування тонкого кека в контрольованому періодичному режимі під дією помірної відцентрової сили тяжіння, щоб осад не ущільнювався до непроникного «шкірного» шару, що прилягає до фільтруючого середовища. Крім того, розмір твердих частинок має бути принаймні більше 10 мікрон, інакше фільтрація буде повільною та непрактичною.

Загалом, фільтрувальні центрифуги не набули значного розповсюдження у порівнянні з седиментаційними. Це зумовлено їх більшою вимогливістю до якості вхідної суміші та малими розмірами простору проєктних параметрів.

Центрифугування з подальшою глибинною фільтрацією, двоступенева глибинна фільтрація або мікрофільтрація-діафільтрація можуть використовуватися окремо для розділення твердої та рідинної фаз, коли цінний білок знаходиться в рідкій фазі. Як показано на рис. 1, центрифугування часто використовується для лізованих клітин, що передбачає виділення твердих частинок білка, які необхідно відокремити від залишків клітин, коли бактерії використовуються як клітини-господарі.

Переваги та недоліки центрифугування та мікрофільтрації можна узагальнити наступним чином (табл. 1).

Таблиця 1. Переваги та недоліки центрифугування

| Переваги | Недоліки |
|--|--------------------------------------|
| <p>Менше тангенціальне навантаження порівняно з тим, що створюється при фільтрації в тангенціальному потоці; Залишки клітин не забруднюють і не закупорюють пори, що призводить до забивання фільтру; це добре для більшого вмісту твердої фази в суспензії; Видалення твердих частинок розміром до 0,2 мкм за високих значень G; Компактність; Менше часу простою (через забруднення); Можливо виконати один або кілька проходів очищення; Надійність</p> | <p>Трохи вищі капітальні витрати</p> |

Загалом, центрифугування має багато переваг над фільтруванням в якості етапу виробничого процесу. Зокрема, воно пов'язане з меншими тангенціальними навантаженнями, ніж тангенціальна фільтрація, клітинний дебрис не закупорює пори фільтру, тим самим знижуючи його продуктивність, дозволяє позбутися твердих частинок розмірами навіть до 0,2 мкм, обладнання для центрифугування надійніше й компактніше (хоч і дорожче), вимагає менше часу на відмивку, дозволяє проводити розділення у кілька проходів, і при цьому має порівнянні експлуатаційні витрати, не враховуючи потребу в періодичній заміні фільтр-елементів з причини незворотного забивання. Крім того, це дуже надійна система.

Частинки твердої фази в суспензії зазвичай дуже малі, в області 10 мікрон і нижче, а іноді навіть в діапазоні 1-2 мікрон. Тоді, як невелика різниця густини впливає більше на седиментацію, ніж на фільтрацію, як обговорювалося вище, дрібні біологічні твердофазні компоненти впливають на глибинну фільтрацію, засмічуючи шляхи проходження фільтру, що призводить до швидкої появи значного падіння тиску на глибинному фільтрі. Для успішного проведення мікрофільтрації, мембрана повинна завжди залишатися «чистою» або «незабрудненою», що досягається за допомогою конфігурації мембрани з перехресним потоком і з використанням високої тангенціальної швидкості для очищення поверхні мембрани, а також використанням очисного засобу для миття мембрани під час простою. В подальшому забруднення все рівно призводить до необхідності заміни мембрани та пов'язаного з цим простою в роботі, що є

ключовим недоліком мікрофільтрації в даному виді застосування. Крім того, у результаті промивання під час виділення білка утворюється набагато більший об'єм рідкого продукту (що у два-чотири рази перевищує початковий об'єм). Це передбачає більш високу вартість процесу, оскільки потрібен більший ступінь концентрування за допомогою подальшої ультрафільтрації та інших процесів для обробки відпрацьованої рідини.

Ще одна можливість полягає в поєднанні центрифугування з глибинною фільтрацією як комплексного підходу до відділення клітин ссавців. Центрифугування забирає основну кількість твердої фази із потоку, що виходить із ферментера до біореактора, тоді як глибинний фільтр найкраще працює для видалення субмікронних частинок із потоку з низьким вмістом твердих речовин, що виходить із центрифуги.

Висновки. Відцентрова сепарація має чимало важливих застосувань в рекомбінантних біотехнологіях, зокрема у виробництві лікарських засобів біологічного походження. Крім того, центрифугування має тісно поєднуватися з іншим технологічним обладнанням, як на вході, так і на виході, щоб весь процес працював відповідно до інтегрованого підходу. Різноманітні показники розділення для центрифугування включають вихід за білком, вміст суспендованих твердих речовин у фугаті, продуктивність і життєздатність клітин. Загалом, результати досліджень дозволили окреслити простір дизайну оптимального відцентрового розділення для рекомбінантних біотехнологій.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Zhang J., Greasham R. Chemically defined media for commercial fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1999. Vol. 51. P. 407–421.
2. Kim J., Kim K.H. Effects of minimal media vs. complex media on the metabolite profiles of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*. 2017. Vol. 57. P. 64–71. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017>.
3. Campani G., Santos M.P.d., Silva G.G.d., Horta A.C.L., Badino A.C., Giordano R.d.C., Gonçalves V.M., Zangirolami T.C. Recombinant protein production by engineered *Escherichia coli* in a pressurized airlift bioreactor: A techno-economic analysis. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 2015. Vol. 98. P. 102–109. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cep.2015.10.020>.
4. Figueiredo D.B., Carvalho E., Santos M.P., Kraschowetz S., Zanardo R.T., Campani G., Silva G.G., Sargo C.R., Horta A.C.L., Giordano R.d.C., Miyaji E.N., Zangirolami T.C., Cabrera-Crespo J., Gonçalves V.M. Production and purification of an untagged recombinant pneumococcal surface protein A (PspA4Pro) with high-purity and low endotoxin content. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2015. Vol. 42. P. 1399–1408.
5. Shiloach, J., & Fass, R. Growing *E. coli* to high cell density—a historical perspective on method development. *Biotechnology Advances*. 2005. Vol. 23, No. 5. P. 345–357. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.04.004>.
6. Lee, S. Y. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*. 1996. Vol. 14, No. 3. P. 98-105. DOI: [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(96\)80930-9](https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)80930-9).
7. Keasling, J. D. Manufacturing molecules through metabolic engineering. *Science*. 2010. Vol 330, Issue 6009. P. 1355-1358. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1193990>.
8. Leung W. *Centrifugal Separations in Biotechnology*. Elsevier, 2007. 298 p. ISBN: 978-1-85-617477-0.

1.24 ВИРОБНИЦТВО ТА ЗАСТОСУВАННЯ МОРСЬКОГО КОЛАГЕНУ У ФАРМАЦІЇ

Січевлюк А.В.¹, Мокроусова О.Р.^{1,2}

¹Київський національний університет технологій та дизайну

²Державний торговельно-економічний університет
mokrousova.or@knutd.edu.ua

Розглянуто основні аспекти виробництва та напрямів застосування морського колагену у фармації. Проведено аналіз сучасних методів екстракції колагену з морських біоресурсів, порівняно його переваги над тваринним колагеном, а також окреслено перспективи використання в фармацевтичних препаратах та дієтичних добавках. Визначено, що морський колаген є високобіодоступним і безпечним біополімером із великим потенціалом для розвитку нових фармацевтичних форм та біоматеріалів.

Ключові слова: колаген типу I, технологія отримання, екстрагування, властивості, біосумісність.

Колаген є одним із найважливіших структурних білків організму людини, що становить до 30 % загальної кількості білка в тілі. Він відіграє ключову роль у формуванні сполучної тканини, забезпечує міцність і еластичність шкіри, сухожиль, судин та органів. З огляду на це, колаген широко використовується у фармації, косметології, медицині та харчовій промисловості.

Метою статті є аналіз сучасних технологій отримання морського колагену, його властивостей і напрямів використання у фармацевтичній та харчовій промисловості.

Традиційно сировиною для його виробництва є продукти тваринного походження (шкіра, кістки великої рогатої худоби, свиней тощо) (рис. 1) [1, 2].

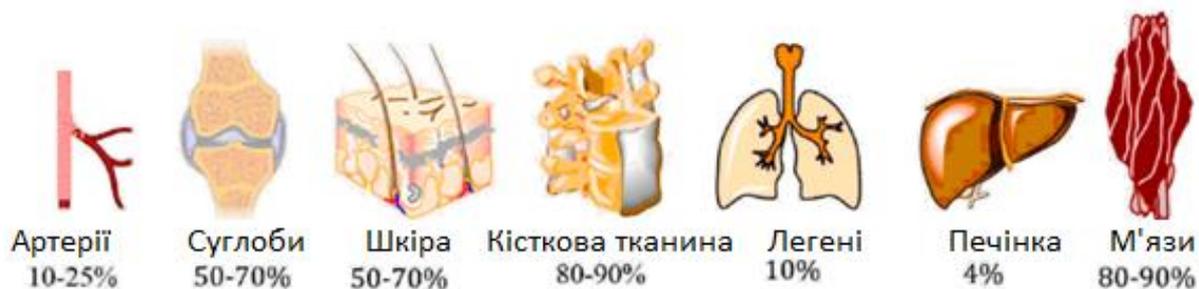


Рис.1. Орієнтовний вміст колагену в різних тканинах

Однак зростаючі вимоги до безпеки, екологічності та релігійні обмеження зумовили пошук альтернативних джерел. Одним із найбільш перспективних напрямів став морський колаген — білок, отриманий із

шкіри, луски, кісток і плавників риб, а також з інших морських безхребетних (рис. 2).



Рис. 2 . Джерела морського колагену

Морський колаген належить переважно до типів I і III, подібних до тих, що присутні в людських тканинах. Його амінокислотний склад характеризується високим вмістом гліцину, проліну та гідроксипроліну, які визначають стабільність триплетної спіралі білка. Важливою властивістю є низька молекулярна маса (приблизно 50–70 кДа), що сприяє кращій біодоступності. Морський колаген легше засвоюється організмом, не викликає алергічних реакцій і має високу біосумісність, що робить його безпечним для фармацевтичного застосування.

Основними джерелами сировини морського колагену є:

- Шкіра риб (тріска, лосось, тунець, морський окунь);
- Луска та плавники;
- Кісткові залишки;
- Молюски, медузи та ракоподібні.

Використання відходів рибної промисловості не лише забезпечує дешеву сировину, а й вирішує екологічну проблему утилізації органічних залишків. Крім того, морський колаген не несе ризику зараження зоонозами (наприклад, губчастоподібною енцефалопатією великої рогатої худоби).

Процес отримання морського колагену складається з кількох етапів:

1. **Підготовка сировини:** миття, подрібнення, демінералізація та знежирення.

2. **Екстракція:** здійснюється кислотним або ферментативним методом [3, 4].

2.1 *Кислотна екстракція* передбачає використання розбавлених кислот (HCl, CH₃COOH), що руйнують структуру сполучної тканини.

2.2 *Ферментативна екстракція* (з використанням пепсину, трипсину) забезпечує вищу чистоту продукту та збереження амінокислотного складу.

3. **Очищення і концентрування:** ультрафільтрація, осадження, ліофілізація.

Сучасні дослідження також описують застосування нанотехнологій та ензиматичних систем для підвищення виходу колагену та збереження його біоактивності.

Отриманий морський колаген характеризується рядом фізико-хімічних властивостей, таких як:

- високою розчинністю у воді;
- стабільною спіральною структурою при температурі до 30 °C;
- здатністю до утворення плівок і гелів;
- значною гігроскопічністю.

Порівняно з тваринним колагеном, морський має нижчу температуру денатурації, проте більшу біологічну активність і кращу проникність через шкіру.

Морський колаген має потенційно широке застосування у фармації та харчовій промисловості. На його основі створено препарати з важливими для здоров'я людини властивостями [5].

Так, морський колаген широко застосовується у виробництві кремів, мазей і гелів для лікування опіків, ран, дерматитів [6]. Його властивість стимулювати фібробласти сприяє швидшій регенерації шкіри. Відомі колагенові гідрогелі, плівки та губки на основі морського білка, які використовуються у хірургії як матеріали для загоєння ран, імплантації та тканинної інженерії. Колаген може виступати матрицею для контрольованого вивільнення лікарських речовин, зокрема антибіотиків і протизапальних засобів. А гідролізований морський колаген використовується в харчових добавках [7] для підтримки здоров'я шкіри, волосся, нігтів і суглобів. Його ефективність підтверджена клінічними дослідженнями.

Основними перевагами морського колагену є:

- висока біодоступність і засвоюваність;
- екологічна чистота сировини;
- відсутність ризику передачі патогенів;
- можливість використання у вегетаріанських і халяль-продуктах;
- широкий спектр фармакологічних застосувань.

Інноваційні дослідження спрямовані на модифікацію молекули колагену, підвищення її стабільності, розроблення наноструктурованих форм і комбінованих біоматеріалів із колагеном.

Висновки. Морський колаген є цінною біоактивною речовиною для фармацевтичної промисловості завдяки своїм фізико-хімічним і біологічним властивостям. Його виробництво сприяє раціональному використанню морських ресурсів, екологічній безпеці та створенню інноваційних лікарських форм. Перспективними напрямками подальших досліджень є оптимізація технологій екстракції, створення композитних біоматеріалів і вивчення механізмів впливу колагену на клітинному рівні.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Müller W.E. The origin of metazoan complexity: porifera as integrated animals. *Integr Comp Biol*. 2003. Vol. ;43 (1). P.3-10. doi: 10.1093/icb/43.1.3.
2. Shoulders M.D, Raines R.T. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem*. 2009. Vol. 78. P.929-958. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833
3. Ahmad M., Benjakul S. Extraction and characterization of pepsin-solubilized collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*). *Food Chemistry*. 2010. Vol. 120(3). P. 817-824. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.019>
4. Pal G.K., Suresh P.V. Sustainable valorisation of seafood by-products: Recovery of collagen and development of collagen-based novel functional food ingredients. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2016. Vol. 37. Part B. P. 201-215. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.03.015>
5. Silvipriya K.S. et al. Collagen: animal sources and biomedical application. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2015. Vol. 5 (03), P. 123-127. DOI: 10.7324/JAPS.2015.50322
6. Lim Y.-S., Ok Y.-J., Hwang S.-Y., Kwak J.-Y., Yoon S. Marine Collagen as A Promising Biomaterial for Biomedical Applications. *Mar. Drugs*. 2019. Vol. 17. P. 467. DOI: 10.3390/md17080467
7. Raman M., Gopakumar K. Fish collagen and its applications in food and pharmaceutical industry: A review. *EC Nutr*. 2018. Vol. 13. P. 752–767

1.25 БАКТЕРІАЛЬНІ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДИ ЯК ОБ'ЄКТ БІОТЕХНОЛОГІЇ

Цуканов І. С., Колесник Т.О., Калініченко О. О., Охмат О. А.

Київський національний університет технологій та дизайну
domanska91@gmail.com, kalinichenko742135@gmail.com,
oxmat.aa@knutd.edu.ua

Робота присвячена оцінюванню потенціалу застосування екзополісахаридів в різних галузях промисловості, сфері охорони здоров'я. У роботі розглянуті основні види бактерій-продуцентів екзополісахаридів, наведено загальну схему отримання екзополісахаридів та обґрунтовані технологічні фактори, що впливають на процес їх біосинтезу. Представлена стисла характеристика окремих екзополісахаридів та їх комерційне значення для різних галузей.

Ключові слова: бактеріальні екзополісахариди, продуценти, умови культивування, біосинтез, практичне застосування.

Полісахариди є макромолекулами, що входять до складу вуглеводів і є однією з найважливіших та найбільш поширених груп сполук, які продукуються бактеріями, грибами та водоростями. Бактеріальні полісахариди або екзополісахариди (ЕПС) є найпоширенішими компонентами біополімерів, виконуючи різні функції.

Відповідно до функціональних ознак екзополісахариди класифікуються на кілька категорій: структурні, сорбційні, поверхнево-активні, інформаційні, з окислювально-відновною активністю [1].

Відповідно до хімічного складу розрізняють гомо- і гетерополісахариди.

Гомополісахариди (від грец. *homo* – однаковий) – це екзополісахариди, які складаються лише з одного типу моносахаридної ланки (мономеру), що багаторазово повторюється, з'єднаного глікозидними зв'язками. Складаються виключно з одного виду цукру, найчастіше це глюкоза (декстран, целюлоза бактеріальна, пулулан). Зазвичай мають відносно просту, лінійну або слабкорозгалужену структуру. Глюкани (α -D і β -D), фруктани та галактани – основні мономери в гомополісахаридах, пов'язаних, як правило, β -1,4 або β -1,3 і α -1,2 або α -1,6 зв'язками. Перші наділяють полімери властивостями жорсткості, другі забезпечують гнучкість молекул [1, 2].

Гетерополісахариди (від грец. *heteros* – інший, різний) – це екзополісахариди, які складаються з двох і більше різних типів моносахаридних ланок або їхніх похідних, які утворюють регулярну повторювану одиницю (олігосахаридний повтор). Містять різноманітні цукри, такі як:

- глюкоза, галактоза, маноза, рамноза;
- аміноцукри (наприклад, N-ацетилглюкозамін);

- уронові кислоти (наприклад, глюкоуронова, галактууронова кислоти);
- нецукрові компоненти (ацетильні, піруватні або сульфатні групи).

Гетерополісахариди утворені D-глюкозою, D-галактозою, L-рамнозою, наприклад, у випадках N-ацетилглюкозамін (GlcNAc), Нацетилгалактозамін (GalNAc) або глюкоуронової кислоти (GlcA). Основні зв'язки мономерів представлені тими ж зв'язками, що і гомополісахаридів. Характеризуються складною, часто розгалуженою структурою, що надає їм унікальних функціональних властивостей (висока в'язкість при низьких концентраціях, здатність до утворення гелів) [1-3].

У біотехнологічних процесах екзополісахариди виконують такі функції:

- слугують матрицями для іммобілізації клітин і ферментів, що сприяє їхній стабільності та можливості багаторазового використання як біокаталізаторів;
- входять до складу біоплівки, які створюють захист для мікроорганізмів під час процесу ферментації;
- виконують роль біофлокулянтів, сприяючи ефективному очищенню води та обробці стічних розчинів.

Продуценти екзополісахаридів та їхнє біологічне значення

Майже всі бактерії можуть продукувати певні типи позаклітинних полімерів, але лише деякі групи є важливими комерційними або дослідницькими продуцентами екзополісахаридів з унікальними властивостями (табл. 1).

Екзополісахариди не є життєвонеобхідними для внутрішньоклітинного метаболізму бактерій, але вони відіграють критичну роль у виживанні, адаптації та взаємодії мікроорганізмів із зовнішнім середовищем (табл. 2).

Галузі застосування бактеріальних екзополісахаридів

Бактеріальні екзополісахариди знаходять широке застосування в різних галузях промисловості, включаючи агропромисловий комплекс та сферу охорони здоров'я.

ЕПС ефективно використовують для: збільшення нафтовидобутку, виготовлення упаковки для харчових продуктів, виготовлення косметичних засобів, капсулювання лікарських препаратів та біологічно активних компонентів (антиоксиданти, вітаміни, пробіотики тощо) з метою збереження їх властивостей, збагачення складу продуктів для відгодівлі тварин тощо.

У харчовій промисловості ЕПС використовують як загусники, стабілізатори та емульгатори у виробництві соусів, напоїв, десертів тощо. У фармацевтичній промисловості та медицині ЕПС використовують завдяки їх біосумісності та нетоксичності. Сфера застосування включає виробництво біоматеріалів, капсул та мікросфер; носіїв АФІ, у тому числі з контрольованим вивільненням активної речовини; імуномодуляторів, допоміжних речовин та основ для виготовлення лікарських форм, медичних виробів для загоювання ранових поверхонь [5].

Таблиця 1. Основні групи бактерій-продуцентів [4]

| Група бактерій | Рід | Тип ЕПС | Комерційне значення |
|----------------|--|----------------------------------|---|
| Протеобактерії | <i>Xanthomonas campestris</i> | Ксантанова камідь (гетеро-ЕПС) | Найбільш комерційно важливий продукт з високою в'язкістю: стабілізатор у харчовій та нафтовій промисловості |
| | <i>Azotobacter vinelandii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Альгінати | Біоматеріали, заміна рослинних альгінатів при гелеутворенні |
| | <i>Acetobacter (Komagataeibacter xylinus)</i> | Бактеріальна целюлоза (гомо-ЕПС) | Біомедична галузь (штучна шкіра, носії АФІ), високоміцні композити |
| Фірмікути | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | Декстран (гомо-ЕПС) | Фармацевтична галузь (замінники плазми крові), хроматографія |
| | <i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i> | ЕПС молочнокислих бактерій | Функціональні продукти харчування (пробіотики, загущувачі, пребіотики) |
| Ціанобактерії | <i>Nostoc spp.</i> , <i>Aphanocapsa spp.</i> | Ціано-полісахариди | Перспективні біоактивні властивості (антиоксидантні, противірусні) |

Таблиця 2 . Біологічне значення ЕПС для клітини-продуцента [4]

| Роль ЕПС | Пояснення |
|--------------------------------|--|
| Захисна функція (глікокалікс) | ЕПС утворюють захисний шар (капсулу або слизовий шар), який запобігає висиханню (десикації) клітин, захищає від фагоцитозу імунними клітинами та від токсичних речовин (важких металів, антибіотиків). |
| Формування біоплівки | ЕПС є ключовим компонентом матриксу біоплівки, забезпечуючи механічну стабільність, адгезію клітин до поверхонь та їхню когезію (зчеплення між собою). Це критично важливо для колонізації поверхонь. |
| Адгезія та колонізація | Дозволяють бактеріям прикріплюватися до поверхонь (грунт, рослини, тканини господаря, медичні імпланти) та починати процес колонізації. |
| Накопичення поживних речовин | ЕПС може зв'язувати та концентрувати іони металів і поживні речовини (особливо воду), створюючи мікросередовище, сприятливе для росту. |
| Імуномодуляція (для патогенів) | У патогенних бактерій капсульні ЕПС часто слугують фактором вірулентності, приховуючи клітину від розпізнавання імунною системою господаря. |
| Рух і дисперсія | Деякі типи ЕПС можуть сприяти руху колоній або, навпаки, їхній дисперсії (розсіюванню) при зміні умов. |

Вказана доволі широка область застосування ЕПС потребує ґрунтового вивчення процесів біосинтезу бактеріальних екзополісахаридів,

включаючи їх склад, структурні характеристики, функціональні властивості та продуктивність мікроорганізмів-продуцентів [6,7].

Завдяки спроможності ефективно утримувати вологу і створювати захисний бар'єр на поверхні шкіри ЕПС є важливим компонентом у складі зволожувальних кремів, масок, шампунів, сироваток тощо.

ЕПС активно використовують для біоремедіації ґрунту та водних ресурсів. Вони ефективно зв'язують важкі метали, токсичні речовини та нафтопродукти [8]. Завдяки здатності екзополісахаридів до біологічного розкладання, їх застосування є екологічно безпечним і перспективним у розрізі пошуку альтернативних синтетичних полімерних матеріалів.

Окремі екзополісахариди, які синтезуються азотфіксуючими бактеріями, такими як *Rhizobium* та *Azotobacter*, позитивно впливають на структуру ґрунту, сприяють збереженню вологості та збільшують його родючість, застосовуються як біостимулятори для росту рослин і захисні засоби проти посухи [9].

Отже, ЕПС є унікальними біополімерами, сучасні дослідження яких зосереджені на вдосконаленні технологій отримання і розширенні напрямів їх застосування [10].

Виділення екзополісахаридів

Екзополісахариди є високомолекулярними біополімерами, які продукуються і виділяються мікроорганізмами в оточуюче середовище. Вони відіграють фундаментальну роль у формуванні біоплівки, забезпеченні захисту клітин від впливу стресових чинників, а також сприяють їх взаємодії з іншими мікроорганізмами та організмом-носієм [11, 12]. Дослідження властивостей екзополісахаридів і розробка їх практичного застосування в біотехнології, харчовій, фармацевтичній та медичній промисловості вимагають впровадження ефективних методів їх виділення та очищення, а саме:

1. Попередня підготовка біомаси.

Першим етапом виділення екзополісахаридів є відділення біомаси клітин від культуральної рідини. Вибір методології екстрагування залежить від умов культивування мікроорганізмів та може включати різні підходи: використання центрифугування для відокремлення клітин від культуральної рідини; застосування фільтрації через мембрани з різним рівнем пористості; проведення обробки теплом або ультразвуком, що сприяє виділенню екзополісахаридів, асоційованих з поверхнями клітин.

2. Методи виділення екзополісахаридів.

Для виділення ЕПС застосовують низку методів:

- хімічне екстрагування передбачає використання хелатуючих агентів, зокрема етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА), формальдегіду або натрію гідроксиду для руйнування міжмолекулярних зв'язків і виділення екзополісахаридів;

- фізико-хімічні способи включають нагрівання, автоклавування, ультразвукову обробку чи застосування мікрохвильового опромінювання;

- механічні методи передбачають інтенсивне струшування чи гомогенізацію, сприяють відокремленню поверхневих полісахаридів.

3. Осадження та концентрування.

Для виділення екзополісахаридів з культуральної рідини застосовують низку методів:

- осадження за допомогою спиртів, таких як етанол або ізопропанол. Це один із найпоширеніших способів, що дозволяє отримати концентровану фракцію ЕПС;

- сольове осадження із використанням реагентів, наприклад, ацетату натрію або сульфату амонію;

- мембранна фільтрація, включаючи ультрафільтрацію та нанофільтрацію, яка забезпечує селективне концентрування високомолекулярних фракцій.

4. Очищення екзополісахаридів.

Отримані полісахариди можуть містити домішки, такі як білки, нуклеїнові кислоти, залишкові компоненти середовища. Для їх видалення застосовуються наступні методи:

- проведення діаліз проти дистильованої води або буферних розчинів;

- хроматографічні методи, зокрема гель-фільтрацію, іонообмінну хроматографію тощо;

- ферментативна обробка, що забезпечує розщеплення небажаних білкових або нуклеїнових домішок.

Сучасні наукові тенденції акцентують увагу на інтеграції традиційних методів виділення із інноваційними нанотехнологіями та удосконаленими мембранними системами. Значний інтерес викликають автоматизовані безперервні системи виділення, які характеризуються високою ефективністю та стабільністю отриманих даних. Крім того, активний розвиток спостерігається у сфері застосування екологічно ощадних методів екстрагування, що базуються на мінімізації використання токсичних та/або агресивних хімічних реагентів [13-17].

Фактори, що впливають на біосинтез екзополісахаридів

Вплив температури. Температура істотно впливає на активність ферментів, задіяних у процесі біосинтезу. Надмірно високі температури призводять до зниження активності ферментів через денатурацію білкових структур. Для більшості бактерій оптимальний температурний діапазон складає 25-35 °С. Низькі температури можуть уповільнювати темпи зростання, але в деяких випадках сприяють накопиченню більш в'язких ЕПС [7].

Вплив поживного середовища. Склад середовища для культивування є одним з основних чинників. Ефективним є використання глюкози, сахарози чи лактози. Встановлено, що обмеження вмісту азоту або фосфору в поживному середовищі зазвичай призводить до посиленого утворення полісахаридів[7].

Вплив рівня рН. Подібно до температури, рівень рН необхідно оптимізувати для кожного конкретного штамму-продуцента, оскільки він

впливає на активність ферментів, задіяних у процесі синтезу. Оптимальний рівень рН залежить від конкретного виду мікроорганізму і зазвичай становить 6,0-7,5 [15, 18, 19].

Висновки. У роботі проаналізовано сучасні літературні джерела щодо природи, складу та сфери застосування екзополісахаридів.

Розглянуто основні методи виділення та очищення екзополісахаридів. Проведений огляд підтверджує, що наявні методики виділення потребують оптимізації, оскільки універсального, високоефективного та відтворюваного підходу до виділення екзополісахаридів не існує. Перспективним напрямом є удосконалення комбінованих методів, які дозволяють підвищити вихід і чистоту продукту при мінімальному впливі на його структуру.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ільїна Т. С. Біоплівки як спосіб існування бактерій у навколишньому середовищі та організмі господаря: феномен, генетичний контроль та системи регуляції їх розвитку. *Генетика*. 2004. № 40. С. 1–12.
2. Garth A. I. Biofilm in chronic wounds. *Wound. Rep. Reg.* 2008. Vol. 3, № 4. P. 26–28.
3. Смирнова Т. А., Діденко Л. С., Азізбекян Р. Р., Романова Ю. М., Структурно-функціональна характеристика бактеріальних біоплівок. *Мікробіологія*. 2010. С. 435–446.
4. Donlan R. M., Costerton J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002. №15(2). P. 167–193.
5. Franklin M. J., Chang C., Akiyama T., Bothner B. New Technologies for Studying Biofilms. In: *Microbial biofilms*. 2nd edition. Washington DS: Asm Press, 2015. P. 1–32.
6. Сидоренко С. В. Роль бактеріальних біоплівок у патології людини. *Інфекції у хірургії*. 2004. Т. 2, №3. С. 16–20.
7. Ткачук Н. В. Біоплівки та біообростання : зб. лекцій для студентів та аспірантів природничих спеціальностей закладів вищої освіти. Чернігів : Десна Поліграф. 2023. 180 с.
8. Lourenco A., Ferreira A., Veiga N., Machado I., Pereira M.O., Azevedo N.F. BiofOmics: a web platform for the systematic and standardized collection of high-throughput biofilm data. *PLoS ONE*. 2012. 39960.
9. Pérez-Rodríguez G., GlezPena D., Azevedo N.F., Pereira M.O., Fdez-Riverola F., Lourenco A. Enabling systematic, harmonised and large scale biofilms data computation: the biofilms experiment workbench. *Comp. Meth. Progr. Biomed.* 2015. Vol. 118. P. 309–321.
10. Flemming, H.C., Neu, T.R., Wozniak, D.J. The EPS matrix: The “house of biofilm cells”. *J. Bacteriol.* 189, 7945 – 7947. 2007.
11. Flemming H. C., Wingender J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010. № 8. P. 623 – 633.
12. Ярош М. Б., Пирог Т. П., Скроцька О. І. Біологічна активність мікробних полісахаридів. *Наукові праці НУХТ*. 2020. Т. 26, № 6. С. 44–55.
13. Hall-Stoodley L., Costerton J. W., Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews*. 2004. Vol. 2. P. 95–108.
14. Yadav M. K., Patra J. K., Vishnuprasad Ch. N., Das G. Role of Biofilms in Environment Pollution and Control. *Microbial Biotechnology. Applications in Agroculture and Environment*. Singapore : Springer Nature, 2017. Vol. 1. P. 377–398.
15. Kostakioti M., Hadjifrangiskou M., Hultgren S. J. Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2013. № 3. a010306.

16. Stewart Ph. S. Antimicrobial Tolerance in Biofilms. In: Microbial biofilms. 2nd edition. *Washington DS : Asm Press*. 2015. P. 269–285.
17. Zhao X., Zhao F., Wang J., Zhong N. Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. *RSC Adv*. 2017. Vol. 7. P. 36670–36683. doi: 10.1039/C7RA02497E
18. Tolker-Nielsen T. Biofilm Development. In: Microbial biofilms. 2nd edition. *Washington DS: Asm Press*. 2015. P. 51–66.
19. Martinez-Checa F., Toledo F. L, Vilchez R., Quesada E., Calvo C. Yield production, chemical composition, and functional properties of emulsifier H28 synthesized by *Halomonas eurihulina* strain H28 in media containing various hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2002. Vol. 58, P. 358–363.

1.26 МІЖНАРОДНИЙ ДЕНЬ ДНК З УКРАЇНСЬКИМ АКЦЕНТОМ: ДОСВІД НАУКОВО-ОСВІТНЬОЇ ТА ВИХОВНОЇ РОБОТИ

Щербатюк Т. Г.¹, Букорос Т. О.¹, Мокроусова О. Р.^{1,2}

¹Київський національний університет технологій та дизайну

²Державний торговельно-економічний університет
shcherbatiuk.th@knutd.edu.ua

Генетика, як дисципліна, є невід'ємною частиною сучасного світу. Однак аналіз взаємодії між генетикою та суспільством може бути складним. Генетика – це не лише біологічне явище, а й протягом десятиліть, культурне явище. Від фільмів до реклами та навіть оголошень у сфері охорони здоров'я, багато хто усвідомлює зростаючу поширеність галузі генетики в сучасному суспільстві [1].

«Генетичний аналіз», «генетичний паспорт», «генетично модифіковані продукти», «генетичні технології», «генетичне редагування», «генетична інженерія», «генетичне прогнозування», «код нації», «генофонд» і «геноцид» – поняття, які у 21 столітті набули широкого поширення в науковій та науково-популярній літературі, і частково увійшли до повсякденної мови.

Поняття «генетизація» було введено в наукову літературу для опису різних взаємопов'язаних та непомітних механізмів взаємодії між генетикою, медициною, біотехнологією, агробіологією та суспільством.

Цей процес передбачає переосмислення індивідуумів з точки зору геному та метагеному, а також інтерпретації цієї інформації задля людського життя, схильностей, використання геннотехнологічного підходу до здоров'я та хвороб [1].

Сучасні молекулярно-генетичні технології, як величезні горизонти можливостей, дозволяють біомедицині, а разом з нею і цивілізації, вийти на абсолютно новий рівень у рамках парадигми «P4»: Predictive, Preventive, Participatory, Personalized (Прогностичний, Превентивний, Партисипативний, Персоналізований), таргетної терапії, генної інженерії та молекулярної біології в цілому.

Інформованість населення в галузі генетики – важлива складова сучасності, яка спонукає викладачів посилювати вивчення феномена спадковості та мінливості [18].

Дисципліна «Генетика» є фундаментальною дисципліною для підготовки біотехнологів за спеціальністю «Біотехнології та біоінженерія».

Студентоцентризм в сучасній освіті передбачає, що освітня діяльність повинна максимально відповідати індивідуальним потребам та стилю навчання здобувачів вищої школи [18]. З урахуванням цього на кафедрі біотехнології, шкіри та хутра Київського національного університету технологій та дизайну здійснюється постійне анкетування

перед початком вивчання генетики, яке допомагає встановити вхідний рівень знань та широту уявлень студентів.

Анкетування виявило [2], що 90 % респондентів надає правильне визначення терміну «ген». Наступне питання про локалізацію гена зафіксувало зниження показника правильних відповідей до рівня 80 %.

При цьому 70% респондентів підтримують впровадження новітньої технології редагування геному в медичну практику.

Відповіді на питання з історії генетики виявилися досить різноманітними. Лише 51% учасників правильно відповів на питання щодо досягнень вчених, пов'язаних з генетикою. Найчастіше респонденти називали Грегора Менделя, автора ідеї існування матеріальних часток спадковості, Томаса Ханта Моргана, який пояснив роль хромосома у спадковості, Джеймса Вотсона та Френсіса Кріка, авторів структури подвійної спіралі ДНК.

Однак, лише незначна кількість учасників (8%) знайома з іменем Григорія Левицького і про те, що він є українським генетиком, цитологом, каріологом, засновником цитогенетики, автором першої монографії з цитогенетики «Матеріальні основи спадковості», яка опублікована в Києві в 1924 році.

Слід визнати, що жоден з респондентів не вказав імені Теодосія Добжанського, українсько-американського генетика та еволюціоніста. Нажаль це є результатом прогалиною державної політики, оскільки ми до сих пір не маємо ані пам'ятної дошки, ані назви вулиці на батьківщині науковців, наприклад, засновника цитогенетики, Григорія Андрійовича Левитського, який в Києві надрукував «Матеріальні основи спадковості» – книгу, що є першим підручником з цитогенетики. З цієї книги вирости всі покоління генетиків країни ХХ ст., а світ прийняв поняття та терміни автора. Інша постать – Феодосій Григорович Добржанський, засновник експериментальної і популяційної генетики, один з засновників синтетичної теорії еволюції [15, 17].

Спадок української науки є фантастично багатим, але він досі недооцінений і повною мірою для нас невідомий, а тим більше – для світового співтовариства. Тепер є добре відомим, що за радянської доби панувала ідеологія замовчування обсягу наукового внеску українських вчених у світову науку. За словами Євгена Сверстюка, українським національно-свідомим людям нав'язувалася хвороба – амнезія пам'яті. І лише із здобуттям незалежності почали з'являтися наукові розвідки, дослідження, передачі на радіо, телебаченні, в інтернет-просторі про видатних вчених, які з різних причин замовчувались [11, 12].

Василь Андрійович Шендеровський, професор, доктор фізико-математичних наук, провідний науковий співробітник Інституту фізики НАН України, віце-президент Українського фізичного товариства, Лауреат премій Фонду Тараса Шевченка та імені Івана Огієнка, започаткував авторську програму «Нехай не гасне світ науки» і п'ять років вів її разом з журналісткою Еммою Антонівною Бабчук на Першому каналі

Українського національного радіо. Відомий вчений за понад 30 років своєї активної діяльності в галузі історії науки відвідав десятки закладів освіти, доводячи до читачів правду про науковців, імена яких в Україні не були відомі з багатьох причин: одні піддавалися гонінню і навіть фізичному знищенню більшовицькою владою – «враги народа», і інші – емігрували.

Надихаючись трьома прикладами просвітницької діяльності на ниві історичної справедливості, ініціативна група кафедри та працівників науково-технічної бібліотеки Київського національного університету технологій та дизайну в 2023 р. започаткувала освітньо-науковий культурологічний проєкт «Стежками видатних земляків-науковців» [16].

Перший приклад – громадянська позиція та багаторічна діяльність аналізу і популяризації набутків видатних земляків В.А. Шендеровського, автора чотиритомної книги «Нехай не гасне світ науки».

Зокрема, Василь Андрійович Шендеровський багато зробив для повернення імені Івана Пулюя, який пояснив природу виникнення Х-променів та їх здатність іонізувати газ [7]. Український фізик та електротехнік був першим розробником вакуумної трубки (рурки), як прототипу сучасних рентгенівських апаратів.

Другий приклад - діяльність Степана Степановича Костишина, доктора біологічних наук, професора, академіка Академії наук Вищої школи України, завдяки ініціативі якого у Чернівцях відкрита меморіальна дошка на будинку, де народився і жив Ервін Чаргафф, а також перейменована вулиця та встановлена пам'ятна дошка академіку Миколі Вавілову [13].

Третій приклад – перлина країни- найсучасніший інформаційно-просвітницький центр G-MUSEUM (gmuseum.org.ua) України та Європи, який працює та надихає завдяки підтримки мецената, професора Миколи Івановича Гуменюка, президента Корпорації «Юрія-Фарм», самовідданої праці директорки музею Наталії Василівни Гоцуляк та іншим небайдужим людям прекрасного Городка, що на Хмельниччині. У комплексі все цікаво: природничі, історичні експозиції, «Art-простір» - місце для виставок художників, майстер-класів, але нас неймовірно вразило достовірне відтворення лабораторії професора Сергія Миколайовича Виноградського, видатного мікробіолога, який з 1905 по 1917 роки жив та працював у м. Городок [20].

Щоб досягти хоч частини результатів просвітителів і меценатів нашого часу, яких ми взяли в приклади, потрібно дуже багато, і ми почали цей шлях - започаткували освітньо-науковий культурологічний проєкт «Стежками видатних земляків-науковців» [16]. Основна ідея проєкту – висвітлення та популяризація наукових відкриттів та досягнень просвітителів і меценатів української землі.

Перший рік функціонування проєкту «Стежками видатних земляків-науковців» було присвячено діяльності Григорія Андрійовича Левитського, фундатора світової цитогенетики, автора терміну «каріотип», українцю за походженням, який народився, навчався й працював в Україні та загинув у

сталінських таборах. 100 років тому в Києві вийшла друкована праця Григорія Левитського «Матеріальні основи спадковості», що є першим підручником з цитогенетики. За ним навчалися всі наступні покоління генетиків країни ХХ ст., а світ прийняв поняття та терміни автора.

Перша експедиція проєкту «Стежками видатних земляків-науковців» розпочалася з відвідування села Білки Житомирської області – батьківщини видатного засновника цитогенетики, який народився в 1878 році у родині сільського священника. Початкову освіту Григорій Левитський отримав у церковно-приходській школі с. Білки, далі продовжив навчання у м. Києві [4-5, 10], а потім навчався в Колегії Павла Галагана, де нині функціонує Національний музей літератури України. Успішно закінчивши Колегію, Григорій Левитський у 1897 р. вступив до Київського університету Святого Володимира на природничий відділ, де спеціалізувався на кафедрі ботаніки. Від Колегії до університету маршрут пролягає Терещенківською вулицею, на честь Н. А. Терещенка, українського підприємця та благодійника. В Київському політехнічному інституті Григорій Левитський працював лаборантом ботанічного відділення в 1902 р. після закінчення Університету Святого Володимира, а потім, після московської в'язниці і депортації за межі країни в 1911 р., – викладачем морфології і систематики рослин [4, 5].

У 1922 р. на базі трьох лабораторій агрономічного факультету Київського політехнічного інституту Григорієм Андрійовичем Левитським було реалізовано ідею та створено Інститут селекції в Києві. Результати, отриманні в лабораторії, стали фундаментом виведення сортів цукрових буряків та науково-прикладною основою цукрової промисловості усього колишнього СРСР [9]. Керівництво Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України дбайливо зберігає історію та погоджується з пропозицією учасників проєкту увічнити пам'ять великого вченого.

У липні 1923 року в Цитологічній лабораторії Наукового інституту селекції у Києві Григорій Андрійович Левитський завершив свою працю «Матеріальні засади спадковості», фактично вписавши своє ім'я в історію пізнання природи спадковості та мінливості. 2024 рік став роком 100-річчя від дня видання цієї 165-ти сторінкової праці Державним видавництвом України. Екземпляри цієї книги зберігаються у фондах Національної бібліотеки України імені В. І. Вернадського і Національної наукової медичної бібліотеки України (ННМБУ) [14]. Ця праця Г. А. Левитського стала логічним узагальненням результатів його власних досліджень, аналізу світової літератури та систематизації даних про основи спадковості як самостійної дисципліни. Одна з мотивацій створення «Матеріальних засад спадковості» була обумовлена необхідністю підготовки підручників, які б узагальнювали досягнення науки й практики та відрізнялися простотою та ясністю викладеного матеріалу.

«Дорогому вчителю Сергію Гавриловичу Навашину» присвятив професор Григорій Андрійович Левитський свої «Матеріальні основи спадковості» – працю, яку біологи вважають першим підручником з

цитогенетики не лише у вітчизняній, а й в світовій науці. Ця книга як «спроба короткого, але систематичного викладу вчення про матеріальні основи спадковості, як самостійної дисципліни, що формується із синтезу експериментальної генетики, цитології, ембріології та механіки розвитку» [8]. «Матеріальні основи спадковості» Г. А. Левитського стали логічним узагальненням результатів власних досліджень, аналізу світової літератури та систематизації даних про основи спадковості як самостійної дисципліни. Окремі глави книги стали передбаченням цілих напрямів у генетиці, таких як цитоплазматична спадковість, епігенетика, філогенетика.

«Матеріальні основи спадковості» містять такі розділи: 1) Загальне вчення про зв'язок спадкових факторів з ядром; 2) Вчення про локалізації спадкових факторів; 3) Фенотип та каріотип; 4) Значення у спадковості цитоплазми; 5) Теорії спадковості та природа генів; 6) Каріогенетична еволюція [8].

100 років тому Г. А. Левитський запровадив поняття каріотип. Пізніше, через 54 роки, коли стане можливим вшановування генія після багатьох років забуття, його учениця О. О. Прокоф'єва-Бельговська скаже, що якраз в цьому розумінні термін «каріотип» і отримав широке застосування. В сучасній цитології термін використовується для морфологічної характеристики хромосомного набору виду. Як і передбачив Г. А. Левитський, введення ним в науку поняття «каріотип» прижилось назавжди і дало змогу систематикам отримати третій рівень наукових досліджень наряду з існуючими «генотипом» та «фенотипом» [4]. Також 100 років тому Г. А. Левитський обґрунтував новий науковий напрям – цитогенетику як «...область дослідження, що займає проміжне місце між «генетикою», у вузькому значенні цього терміну, тобто наукою про явища спадковості, і, цитологією, тобто наукою про клітину. В даний час це – нова дисципліна такого ж узагальненого характеру, як фізико-хімія в галузі неорганічної природи. У зв'язку з цим виникає потреба у її короткому найменуванні «гілогенетика»» [8]. Сьогодні цікаво прослідкувати, коли «хромосоми» стали «хромосомами», і хто змінив термін Г. А. Левитського «гілогенетика» на «цитогенетику». Однак більш важливим є те, що Г. А. Левитський обґрунтував новий напрямок. Згадуються паралелі з історією ноосфери В. І. Вернадського, який обґрунтував у своїх працях про біосферу еволюційний перехід останньої на новий етап, але сам термін було запроваджено слухачами його лекцій.

Григорія Левитського, вже зрілого вченого, автора першого вітчизняного підручника з цитогенетики, запросив Микола Вавилов створити та очолити цитологічну лабораторію у Всесоюзному інституті прикладної ботаніки та нових культур. Стрімка кар'єра принесла досліднику не лише світову славу й визнання, але і тяжкі випробування. 28 червня 1941 р. Левитського арештували по справі Вавилова (арештували влітку 6 серпня 1940 р. у Чернівцях), а 20 травня 1942 року, за офіційним повідомленням, Григорій Андрійович помер у тюремній лікарні [5].

Так, Григорій Андрійович Левитський, один з фундаторів світової цитогенетики, українець за походженням, який народився, навчався і працював в Україні протягом 47 років, загинув в Росії на 64 році свого життя...

Перша (<https://knutd.edu.ua/pod-ta-publkat/news/16603/>) та друга (<https://knutd.edu.ua/pod-ta-publkat/news/16718/>) експедиції в рамках проекту «Стежками видатних земляків-науковців» встановили, що ні в с. Білки, ні на батьківщині, ні в колегії Галагана, ні в КПІ немає жодної згадки про видатного співвітчизника, цитогенетика, внесок якого у світову генетику є дуже суттєвим.

Проектні експедиції 2025 року були присвячені Феодосію Григоровичу Добржанському (25.01.1900–18.12.1975), який відомий у світі як засновник американської школи популяційної генетики, як один із фундаторів синтетичної теорії еволюції. При цьому Ф. Г. Добржанський народився 125 років тому в м. Немирів, нині Вінницької області. Закінчив Київський університет у 1921 р. Працював викладачем зоології агрономічного факультету Київського політехнічного інституту (<https://esu.com.ua/article-22367>).

Синтетична теорія еволюції у її сучасній інтерпретації – це головна, а то й єдина, біологічна теорія, яка розділяється майже всіма професійними біологами. З моменту її створення у першій половині – середині ХХ ст. вона перебуває у постійному розвитку, піддаючись різним інтерпретаціям та уточненням. Роботи її засновників і творців мають не тільки гуманітарний історичний інтерес, а й фундаментальне природниче значення, що відображається, наприклад, у відносно новому напрямку «еволюційна медицина».

В енциклопедії сучасної України (<https://esu.com.ua/article-22367>) стаття Голди Д. М «Феодосій Григорович Добржанський» інформує, що Добржанський запропонував концепцію статевого розмноження і видоутворення; визначив роль природного добору в процесах мікроеволюції; встановив, що різні види можуть містити ідентичні гени. Описав явище плейотропії; застосувавши транслокацію між другою і третьою хромосомами *Dr. melanogaster*, продемонстрував лінійне розташування генів у хромосомах; побудував перші цитологічні карти 2-ї, 3-ї і 4-ї хромосом *Dr. melanogaster*. Слід згадати, що Ф. Г. Добржанський був головою Товариства генетики США (1941 р.), Американського товариства природознавців (1950 р.), зоологів (1963 р.). Його праці перекладено французькою, німецькою, італійською, шведською, арабською та іншими мовами [5].

Експедиція учасників проекту до батьківщини Феодосія Григоровича Добржанського в Немирів (<https://knutd.edu.ua/pod-ta-publkat/news/18370/>), на жаль, встановила відсутність зацікавленості з боку адміністрації міста, та на щастя, небайдужість місцевих самородків, діамантом серед яких є Денисенко Микола Федорович, педагог, журналіст, член спілки журналістів України, краєзнавець-дослідник, етнограф, письменник, поет,

поет-пісняр, лауреат літературно-мистецької премії імені Марка Вовчка, спеціаліст-експерт з культурної спадщини, туристичної та музейної справ.

Загалом, в період з осені 2023 р. по літо 2025 р., залучаючи студентів Київського національного університету технологій та дизайну, викладачі кафедри біотехнології, шкіри та хутра та працівники науково-технічної бібліотеки пройшли «стежками» двох видатних земляків-науковців – Григорія Андрійовича Левитського та Феодосія Григоровича Добржанського.

У пошуках платформи для обговорення та поширення набутої інформації в Київському національному університеті технологій та дизайну запроваджено щорічне проведення «Міжнародного дня ДНК».

Щороку 25 квітня світова спільнота відзначає Міжнародний день ДНК, що збігається з історичною датою, коли британські вчені Джеймс Вотсон (James Watson) і Френсіс Крік (Francis Crick) в Кембриджському університеті (Cambridge University), Велика Британія), а також Моріс Вілкінс (Maurice Wilkins) і Розалінда Франклін (Rosalind Franklin) в Королівському коледжі Лондона (King's College London) з колегами опублікували в 1953 р. в журналі «Nature» фундаментальні праці про структуру ДНК. З того часу дата 25 квітня знаменує поворотний момент в розумінні еволюційної ролі ДНК і початок віку геномних технологій. У США День ДНК вперше відзначили в 2003 р. за рішенням Сенату та нижньої палати Конгресу США. Однак це передбачало лише проведення разового заходу – на честь святкування 50-річчя відкриття, а також успішного завершення в 2003 р. фундаментального проєкту Human Genome Project з розшифрування геному людини. Останнє ініціювало постгеномну епоху людства. Проведений тоді офіційний захід став сьогодні традицією і проводиться Національним інститутом досліджень геному людини США (National Human Genome Research Institute – NHGRI). Різними організаціями наукового світового співтовариства 25 квітня оголошено Міжнародним днем ДНК або Всесвітнім днем ДНК [16].

На наш погляд, заходи з відзначення «Міжнародного дня ДНК» можуть включати кілька напрямів: семінари, присвячені сучасним досягненням постгеномних технологій та історичним подіям; конкурси проєктів арт-об'єктів з метою вшанування та розповсюдження біологічної та історичної інформації; створення фільмів, прокладання туристичних маршрутів, пов'язаних з іменами видатних українських вчених.

В 2024 р. науковий семінар під назвою «Міжнародний день ДНК – 2024», вперше проведений в КНУТД, було присвячено до століття з дня видання «Матеріальних основ спадковості» Григорія Андрійовича Левитського. Захід було проведено у форматі популяризації історичних фактів та ролі українських науковців у контексті формування генетики; висвітлення технічних аспектів світового наукового відкриття структури ДНК; ознайомлення із аспектами сучасної цитогенетики та вірусології; презентації соціо-культурних експедицій стежками науковців-

співвітчизників та розвитку напряму біоніки в архітектурі та дизайні на основі структури ДНК.

На семінарі О. Р. Мокроусова, завідувач кафедри біотехнології шкіри та хутра, д. т. н., професор, презентувала результати проведеного опитування 173 респондентів щодо генетизації суспільства.

В. С. Мартинюк, професор кафедри біофізики та медичної інформатики ННЦ «Інститут біології та медицини» КНУ імені Тараса Шевченка, президент Українського біофізичного товариства, д.б.н., професор, розповів як рентгенівська дифракція допомогла Дж. Вотсону і Ф. Кріку у 1953 р. встановити структуру ДНК.

Т. О. Букорос, директор науково-технічної бібліотеки к. політ. н., доцент зацікавила учасників семінару результатами перших експедицій освітньо-наукового культурологічного проєкту «Стежками видатних земляків-науковців», завдяки яким стали доступні маловідомі факти біографії Г. А. Левитського.

Про значний внесок досягнень Г. А. Левитського, фундатора цитогенетики в світову науку розповіла автор ідеї заходу Т. Г. Щербатюк, професор кафедри біотехнології, шкіри та хутра д. б. н., професор.

Сучасні досягнення медичної цитогенетики були відображені у насиченій доповіді «Медична цитогенетика: від мрій до подій» М. І. Ніколенко, директора Медико-біологічного Центру «Геном», д. мед. н., експерта Європейської групи з пренатального скринінгу (IDSSG).

Захоплююче про ДНК вірусів розповіла Н. М. Жолобак, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра КНУТД, к.б.н., старший дослідник Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

Яскравим променем, що висвітлив сміливі рішення використання зображення ДНК в архітектурі та дизайні, стала доповідь студентів Крістіни Гусейнової, Владислави Потупи, Анастасії Петрух та Тамари Косинської.

Кульмінацією семінару став виступ В. А. Шендеровський, провідного наукового співробітника Інституту фізики НАН України, д.ф.м.н., професора, Віце-президента Українського фізичного товариства, лауреата премій Фонду Тараса Шевченка та імені Івана Огієнка.

Подія першого в КНУТД «Міжнародного дня ДНК – 2024», присвяченого до століття з дня видання «Матеріальних основ спадковості» Григорія Андрійовича Левитського відображено на сторінці новин Університету <https://knutd.edu.ua/pod-ta-publkats/news/16864/> [6, 14-16].

Вдруге, 25 квітня 2025 року в Київському національному університеті технологій та дизайну відбувся науковий семінар «Міжнародний день ДНК», який був присвячений 125-річчю з дня народження Феодосія Григоровича Добржанського. Сьогодні впевнено усвідомлюємо, що КНУТД є науковим майданчиком, де вперше оприлюднено невідомі сторінки біографії всесвітньо відомого генетика-еволюціоніста, автора важливої формули «Ніщо в біології не має сенсу, окрім як у світлі еволюції».

У семінарі взяли участь 57 учасників, зокрема представники таких закладів вищої освіти: ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка; Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, Кембриджського університету (Кембрідж, Велика Британія); Ратгерського університету (Нью-Йорк, США), Технологічного університету Цілу (КНР).

Дотримуючись структури першого Дня ДНК у КНУТД, доповіді учасників були представлені за двома напрямками – історичним та науково-технологічним. Традиційно було презентовано результати поїздки на батьківщину видатного вченого.

Найяскравішим фрагментом семінару став виступ професора Кембриджського університету Алли Мадіч, біотехнолога, чие ім'я вписано в Енциклопедію Сучасної України, і яка вітала Міжнародний семінар доповіддю «Кембридж – колиска відкриття подвійної спіралі ДНК. Епігенетика і геноміка».

Микола Денисенко, член Спілки журналістів України, краєзнавець-дослідник з Немирова, презентував раніше невідомі факти під час третьої експедиції наукового проєкту «Стежками видатних земляків-науковців». Його доповідь «Рід Добржанських XVIII – XX ст. Місто Немирів – батьківщина Добржанського Феодосія Григоровича» – це фрагмент книжки, над якою працює сьогодні Микола Федорович.

Виступ Романа Широкова, голови Мед-біо секції Наукового товариства «Shevchenko Scientific Society», співзасновника «Genetics Club», доцента кафедри фармакології, фізіології та нейронауки Ратгерського університету, Нью-Йорк США продемонстрував, що з 1927 року життя видатного ювіляра Добржанського було пов'язане із Сполученими Штатами Америки. Пан Роман розкрив «Три питання до Великого Об'єднувача» та обґрунтовано розповів про Феодосія Добржанського як науковця, гуманіста та філософа.

Науково-практичну частину семінару продовжив Ігор Грецький, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра Київського національного університету технологій та дизайну, к. б. н., доцент із доповіддю «ДНК людини і шимпанзе: історія еволюційної спорідненості». Медичними аспектами сучасної етногеноміки зацікавила учасників семінару Далія-Афаф Зегар, студентка ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Загалом, у роботі заходу взяли активну участь студенти та викладачі факультету хімічних та біофармацевтичних технологій, інституту культури і креативних індустрій, факультету дизайну КНУТД та науково-технічної бібліотеки. Олена Котвицька, завідувачка відділу інформаційних технологій та комп'ютерного забезпечення науково-технічної бібліотеки, та автор принту «Наукова мапа України» презентувала футболки з символікою проєкту «Стежками видатних земляків-науковців». Лариса Семенюк, доцент кафедри туризму та готельно-ресторанного бізнесу, кандидат географічних наук, доцент припустила, що розробка нового

проєкту «Добржанський-фест» може стати важливим інструментом розвитку внутрішнього туризму та туризму пам'яті видатних вчених, сприяти формуванню позитивного іміджу України на міжнародній арені, зміцненню національної єдності, популяризації історико-культурної спадщини та утвердженню цінностей національної пам'яті.

Подія другого в КНУТД «Міжнародного дня ДНК –2025», присвяченого до 125-річчя з дня народження Добржанського Феодосія Григоровича, відображена на сторінці новин Університету <https://knutd.edu.ua/pod-ta-publkat/news/18388/> та в доповідях на інших наукових конференціях [16-19].

Сьогодні Київський національний університет технологій та дизайну з оптимізмом розглядає перші результати освітньо-наукового культурологічного проєкту «Стежками видатних земляків-науковців», оскільки робота над ним допомогла знайти небайдужих до історії науки та батьківщини людей, висвітлити механізми реалізації планів однодумців.

Організація та проведення семінарів «Міжнародний день ДНК» акцентує увагу молодого покоління на важливості збереження національної пам'яті про розвиток науки, інтегрує у сучасні світові тенденції біотехнології та біомедицини.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Mannede, R. Navigating a world of genes: A conceptual analysis of gene fetishism, geneticization, genetic exceptionalism and genetic essentialism / *European Journal of Medical Genetics*, 2021. volume 64, Issue 8, Doi.org/10.1016/j.ejmg.2021.104232.
2. Mokrousova O., Okhmat O., Shcherbatyuk T. Impact of educational popularization of genetics on the development of society. / *Proceedings of the 10th International conference on advanced materials and systems*, Bucharest, Romania, 30-31 October 2024, ICAMS 2024. P.150-154. doi: 10.2478/9788367405805-021
3. Yanitskaya L. V., Posternak N. O., Bilyavsky S. M. Conceptual principles of educational process management in the discipline "molecular biology" *Science and technology today*. 2024. Vol. 13 (41). P.797-808. doi.org/10.52058/2786-6025-2024-13(41)-797-808.
4. Величко М. В., Стефанік В.І. Григорій Андрійович Левитський – український цитогенетик та каріосистематик. // *Цитология и генетика*. 2010.- №2. С. 71-76.
5. Голда Д. М. Генетика. Історія. Відкриття. Персоналії. Терміни. Київ: Фітосоціоцентр. 2004. 128 с.
6. Гусейнова К., Букорос Т., Щербатюк Т. Перші експедиції освітньо-наукового культурологічного проєкту «стежками видатних земляків-науковців. / *Перспективи популяризації історичної спадщини та культурного туризму в Україні: досвід Європейських країн*. Львів: Растр-7, 2024. С. 62-64.
7. Кушерець В., Шендеровський В. Апостол правди і науки: до 175- річчя від дня народження І. Пулюя. – Київ: Знання України, 2020. 93 с.
8. Левитский Г. А. Материальные основы наследственности. К.: Государственное издательство Украины, 1924. 166 с.
9. Роїк М. В., Ковальчук Н.С. Історія становлення та діяльності відділу генетики і цитології. С.41-43.// *Буряківництво і біоенергетика в Україні: історія, наука, виробництво, люди (до 95-річчя ІБКіЦБ НААН України): монографія / за ред. академіка НААН України М. В. Роїка. Вінниця: ТОВ «Нілан-ЛТД», 2017. 352 с.*

10. Торяник В.М. Творчі портрети українських науковців в історичному поступі генетики у ХХ-му столітті (до 200 -ї річниці зо Дня народження Грегора Йогана Менделя). С. 680–726. DOI <https://doi.org/10.30525/978-9934-26-289-0-3/>
11. Шендеровський В. А. Нехай не гасне світ науки: книга перша. Київ: ВД «Простір, 2009. 416 с.
12. Шендеровський В.А. На скрижалях науки. Київ: ВД «Простір», 2023. 336 с.
13. Шинкарук В.Д., Григорюк І.П., Пида С. В., Лихолат Ю.В. Пам'яті видатного ученого-біолога, професора Степана Степановича Костишина. № 1 (2022): Вісник Уманського національного університету садівництва. С.140-142. DOI: <https://doi.org/10.31395/2310-0478-2022-1-140-142>
14. Щербатюк Т. Г., Букорос Т. О. Оцифрована книга – зв'язок поколінь. До століття з дня видання «Матеріальних основ спадковості» Григорія Андрійовича Левитського. Бібліотека. Наука. Комунікація. Актуальні питання збереження та інноваційного розвитку наукових бібліотек : матеріали Міжнар. наук. конф. (3–5 жовт. 2023 р.) / НАН України, Нац. б-ка України ім. В. І. Вернадського, Асоц. б-к України; відп. ред. О. М. Василенко, Київ, 2023. С. 326-328.
15. Щербатюк Т. Г., Букорос Т. О. До століття з дня видання «Матеріальних основ спадковості» Григорія Андрійовича Левитського. / Матеріали VIII Міжнародна науково-практичної конференція «Тернопільські біологічні читання – Ternopil Bioscience – 2024» С. 434-437.
16. Щербатюк Т. Г., Букорос Т. О. Наукова спадщина мистецтвом дизайну та туристичними індустріями. /Освіта для сталого майбутнього: екологічні, технологічні, економічні і соціокультурні питання: колективна монографія за матеріалами Всеукраїнської конференції /за ред.. В.П. Плаван, А.О. Косич, О.О. Бутейко, Київ: КНУТД, 2024. С. 295-299.
17. Щербатюк Т.Г., Букорос Т.О. Освітньо - науковий проєкт кнутд «стежками відатних земляків-науковців»до 125–ліття з дня народження Феодосія Григоровича Добржанського / Матеріали IX Міжнародної науково-практичної конференції «Тернопільські біологічні читання – Ternopil Bioscience – 2025» С. 313-316.
18. Щербатюк Т. Г., Охмат О. А. Гейміфікація під час викладання генетики у Київському національному університеті технологій та дизайну./ Фактори експериментальної еволюції організмів. Т.36. С.184-187. DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v36.1735>
19. Щербатюк Т.Г. «Стежками відатного земляка-науковця»: до 125-річчя від народження Добржанського Феодосія Григоровича./ Фактори експериментальної еволюції організмів. Т.36. С.204. DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v36.1735>
20. Щорічний дослідницький звіт. Вісник клубу ім.. Сергія Виноградського. – К.: ТОВ «Вістка», 2023.- 184 с.

1.27 НАНОЧАСТКИ ТА ПОТЕНЦІАЛ ЗАСТОСУВАННЯ ЇХ АНТИМІКРОБНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ

Писаренко П. О., Охмат О. А.

Київський національний університет технологій та дизайну

pysarenko1@gmail.com, oxmat.oa@knutd.edu.ua

Робота присвячена аналізу наночастинок, сучасних підходів до їх синтезу, оцінці впливу на властивості готових матеріалів, включаючи антимікробні властивості. У роботі розглянуто основні види наночастинок, методи їх отримання та особливості їхньої антимікробної активності. Особливу увагу приділено ролі нанотехнологій у підвищенні ефективності виробничих процесів, зниженні екологічного навантаження та досягненні цілей сталого розвитку різних галузей.

Ключові слова: *наночастки, механізм дії, антимікробна активність, властивості матеріалів.*

Протягом останніх двох десятиліть було зафіксовано значний прогрес у розвитку нанотехнологій, оскільки дослідники відкрили безліч способів створення та застосування наноструктурованих матеріалів у різних галузях – медицині, фармації, харчовій та текстильній промисловостях, сільському господарстві [1].

Мета дослідження – аналіз сучасних підходів до синтезу та використання наночастинок у різних галузях.

Об’єкт дослідження – процеси синтезу наноматеріалів з комплексом необхідних властивостей.

Предмет дослідження – властивості наночастинок, методи їх синтезу та їх практичне застосування.

Наночастки (NPs) можуть значно різнитися за розміром і формою. Залежно від вимірності вони поділяються на: нульвимірні (такі як квантові точки, де довжина, товщина та висота визначаються однією точкою), одновимірні (наприклад, нанотрубки), двовимірні (такі як графен), тривимірні (наприклад, наночастки металів Ag, Au, Cu тощо).

Наночастки можуть мати різну морфологію – сферичну, циліндричну, трубчасту, конічну, спіральну, плоску або неправильну форму, а також бути пористими чи щільними, аморфними чи кристалічними [2].

Їхні унікальні властивості значною мірою залежать від методу синтезу, але навіть незначна зміна технологічного процесу може суттєво вплинути на ключові характеристики матеріалу. Після синтезу (за одним із двох основних підходів) наночастки піддають аналізу – визначають їх розмір, склад, поверхневий заряд та морфологію поверхні. Для цього застосовують широкий спектр методів – від візуального аналізу до рентгеноструктурного аналізу [3, 4].

Благородні метали – такі як золото, срібло та паладій – у формі наночасток є одними з найперспективніших напрямів у нанотехнологіях. Вони широко використовуються для створення біоінженерних матеріалів, діагностичних систем і терапевтичних засобів. Наночастки срібла (AgNPs) та золота (AuNPs) мають особливе значення завдяки своїм оптичним, каталізаторним і антимікробним властивостям, а також ефективності в цільовій доставці лікарських засобів при лікуванні різних видів раку [5]. Крім того, наночастки срібла відомі своїми потужними антимікробними властивостями, завдяки чому широко застосовуються в медичних засобах і дезінфекції [6]. Наночастки золота, у свою чергу, демонструють високу каталізаторну активність і використовуються в хімічних реакціях та системах доставки ліків [7]. Порівняно з іншими металевими або оксидними наночастками, AgNPs та AuNPs вирізняються вищою стабільністю та здатністю ефективно перетворювати й передавати енергію на нанорівні. Ці властивості роблять їх незамінними інструментами для науковців, які шукають інноваційні рішення у медицині, фармації, екології та матеріалознавстві [8, 9]. Більше того, подібні наночастки вже присутні у повсякденних товарах – засобах особистої гігієни, контейнерах для зберігання їжі, косметичці, медичних пов'язках тощо [3].

Наноматеріали зазвичай класифікують залежно від методу синтезу та походження вихідних речовин – вони можуть бути органічними, неорганічними або на основі вуглецю [10].

Органічні наночастки широко використовують в біомедицині та фармації як системи керованого вивільнення лікарських речовин, зокрема шляхом ін'єкцій у певні органи [11]. До цієї категорії належать міцели, ліпосоми, дендримери, полімерні та білкові наночастки, а також наногелі.

Ліпосоми та міцели – це біорозкладні наночастки з порожнистим ядром (нанокапсулою) [11, 12]. Такі структури є чудовими матрицями для транспортування ліків. Міцели найчастіше використовуються для доставки водонерозчинних препаратів: їх гідрофільна зовнішня оболонка захищає вміст від фізіологічних процесів, тоді як гідрофобне ядро здатне утримувати сполуки, нерозчинні у воді [13].

Ліпосоми – це синтетичні везикули з високою гнучкістю, які можна поєднувати з різними ліпідними речовинами, створюючи широкий спектр структур, розмірів і складів. Їхня головна перевага – здатність зливатися з клітинними мембранами та вивільняти активну речовину [14, 15]. Багатошарові ліпосоми містять кілька ліпідних шарів, розділених гідрофільними проміжками, що дозволяє інкапсулювати як ліпофільні, так і гідрофільні речовини [16]. Сьогодні ліпосоми активно досліджуються для терапії раку, цільової доставки ліків та антимікробного лікування [15].

Дендримери мають надзвичайно малий розмір (1–5 нм) і розгалужену структуру, що дозволяє зменшити їх цитотоксичність шляхом зв'язування з біосумісними сполуками. Вони можуть служити носіями для вакцин або ліків [18, 19]. Попри свою універсальність, деякі дендримери виявили високу токсичність і схильність до агрегації [17].

Полімерні наночастки можуть бути синтетичними або природними й поділяються на нанокапсули та наносфери. Вони здатні утримувати високу концентрацію лікарських речовин і забезпечувати їх цільове вивільнення [20, 21]. Наприклад, наночастки на основі поліметилметакрилату (PMMA) показали перспективність у біомедичних застосуваннях завдяки нетоксичності, низькій вартості, мінімальним запальним реакціям і простоті обробки [22].

Білкові наночастки утворюються шляхом самоорганізації білкових полімерів, отриманих із тваринних або рослинних джерел (колаген, желатин, альбумін, еластин). За допомогою генетичної інженерії білкові субодиниці об'єднуються в ефективні системи доставки ліків [23]. Відомим прикладом є препарат Abrahane®, який доставляє протиракову речовину паклітаксел за допомогою альбуміну й схвалений FDA для лікування раку молочної залози [24].

Наногелі – це наночастки гелеподібної структури розміром від 1 до 100 нм [25]. Порівняно з іншими носіями ліків, наногелі мають меншу швидкість передчасного вивільнення, можливість інкапсуляції різних терапевтичних сполук і зручність введення (парентерального або через слизові оболонки). Їх активно досліджують для доставки нуклеїнових кислот, цитокінів і вакцин, зокрема назальних вакцин, які мають найбільший потенціал [26].

До *неорганічних наночасток* належать металеві, оксидні, кремнійвмісні наночастки.

Металеві наночастки можуть бути отримані з різних металів за допомогою «згори вниз» або «знизу вгору» підходів [27]. Найчастіше використовують золото (Au), срібло (Ag), залізо (Fe), алюміній (Al), кадмій (Cd), кобальт (Co), мідь (Cu) і цинк (Zn) [16, 28]. Згадані наночастки характеризуються унікальними властивостями – високим співвідношенням площі поверхні до об'єму, змінним електричним зарядом, різною формою (сферичною, циліндричною тощо), реактивністю та чутливістю до зовнішніх факторів (вологи, температури, освітлення тощо).

Оксиди металів отримують шляхом модифікації властивостей відповідного металу. Наприклад, наночастки заліза (FeNPs) легко окиснюються до оксиду заліза на повітрі, що підвищує їхню реактивність [38]. Найчастіше синтезують Al_2O_3 , Fe_2O_3 , Fe_3O_4 , SiO_2 та TiO_2 , які мають покращені характеристики порівняно з вихідними металами [16, 29].

Квантові точки – наночастки напівпровідникової природи (зазвичай CdSe, CdTe або PbS) розміром 2–10 нм, які мають унікальні оптичні властивості. Вони застосовуються у світлодіодах, сонячних елементах і біовізуалізації [30].

Кремнійвмісні наночастки (SiO_2) характеризуються біосумісністю, хімічною та термічною стабільністю і низькою токсичністю, що робить їх перспективними для доставки ліків, медичної візуалізації та конструювання біосенсорів [31].

Серед напівметалевих наночасток виділяють селенові, сурм'яні та вісмутові наноматеріали, що мають специфічні електронні, оптичні та терапевтичні властивості [32].

Комбінації металевих наночасток з іншими наноструктурами відкривають нові можливості. Наприклад:

- золото + кремній – для фототермічної терапії раку, де частинки нагрівають пухлинну тканину під дією ІЧ-світла [33];
- золото в ліпосомах – як керована система доставки ліків для хіміотерапії з мінімізацією побічних ефектів [34];
- золото, покрите мезопористим SiO_2 – для комбінованої діагностики та терапії (т. зв. «теранностики») [35];
- срібло в гідрогелях – для антибактеріальних перев'язувальних матеріалів, що забезпечують поступове вивільнення іонів срібла та прискорюють загоєння ран [36].

До вуглецевих наночасток належать фулерени, графен, вуглецеві нанотрубки, нанофібри та технічний вуглець (carbon black) [37]. Фулерени – це сферичні молекули, що складаються з до 1500 атомів вуглецю, сполучених sp^2 -зв'язками [38]. Вони можуть служити носіями антибіотиків і противірусних препаратів, а також використовуються у створенні контрастних агентів для МРТ, рентгенівських зображень, у фотодинамічній терапії та доставці генів [39]. Графен – це двовимірна решітка атомів вуглецю з гексагональною структурою [40]. Вуглецеві нанотрубки (CNTs) мають трубчасту форму, діаметром близько 1 нм і довжиною 1–100 нм. Завдяки своїй будові вони можуть проникати в клітини шляхом ендоцитозу або прямої інсерції, що робить їх перспективними носіями біоактивних речовин [41]. Вуглецеві нанофібри відрізняються від нанотрубок формою – листки графену можуть згортатися у конічну або чашоподібну структуру замість циліндричної [42]. Технічний вуглець (carbon black) – це аморфний вуглець, зазвичай сферичної форми, діаметром 20–70 нм. Через сильну взаємодію між частинками він утворює агрегати до 500 нм [43].

Методи синтезу наночасток металів

Наночастки металів (НЧ) зазвичай отримують із використанням нанотехнологій шляхом відновлення відповідного металу до його нанорозмірного стану. Їх синтез може здійснюватися різними фізичними, хімічними та біологічними методами.

Фізичні методи запобігають забрудненню наночасток залишками розчинників, однак потребують значної кількості енергії для процесів конденсації та випаровування. Висока регуляція температури та тиску, необхідна для цих методів, суттєво підвищує собівартість синтезу.

Хімічні методи передбачають використання відновлювальних і стабілізуювальних агентів, які запобігають агрегації наночасток, забезпечуючи високу чистоту та стабільність кінцевого продукту. Проте застосування великої кількості сильнодіючих реагентів може призвести до забруднення синтезованих наночасток.

Біологічний синтез металевих наночастинок викликає все більший інтерес, оскільки пропонує екологічно безпечну та ефективну альтернативу традиційним фізико-хімічним методам. Біологічна (або «зелена») технологія синтезу варіюється залежно від типу відновлювального агента – мікроорганізму (бактерії, гриби) або рослини.

Одним із найекономічніших і найбільш екологічно безпечних способів одержання наночастинок металів є використання рослин, які діють як своєрідні «біофабрики» наночастинок. Потенціал масштабного виробництва НЧ за допомогою рослин є надзвичайно великим завдяки їхній поширеності, легкій доступності та здатності рости в різних кліматичних умовах. Крім того, рослинний синтез не потребує дорогих або токсичних реагентів, що використовуються у звичайних методах, тому є більш безпечним та сталим підходом.

Однак використання рослин має і певні недоліки – зокрема, варіативність розміру та форми наночастинок, що може залежати від виду рослини, умов її вирощування та часу збору [44].

Останні дослідження показали, що врожайність рослинного синтезу може досягати кількох грамів наночастинок з одного кілограма біомаси, що робить цей метод цілком придатним для промислового виробництва [45].

З погляду методології, синтез наночастинок зазвичай реалізується за двома відомими підходами: «знизу вгору» (bottom-up) та «згори вниз» (top-down).

- Підхід «знизу вгору» є конструктивним процесом, який передбачає послідовне формування наноматеріалів – від атомів до кластерів, а потім до наночастинок. До цього підходу належать методи sol-gel, спінінг, біосинтез [46], а також седиментація, відновлення, «зелений» синтез, центрифугування, біохімічний синтез, атомарне нашарування та молекулярне самозбирання [47].
- Підхід «згори вниз» полягає у зменшенні розмірів вихідного матеріалу до нанометрових масштабів шляхом руйнування первинної структури за допомогою фізичних сил. До таких методів належать механічне подрібнення, нанолітографія, лазерна абляція, розпилення та термічний розклад [48].

Більшість наночастинок срібла, золота, заліза, кобальту, нікелю та деяких їхніх оксидів (наприклад, магнетиту або кобальтфериту) синтезують та модифікують за допомогою функціональних хімічних груп, які дають змогу поєднувати НЧ з різними молекулами – зокрема, лікарськими препаратами, пептидами, білками та ДНК [49].

Антимікробна активність і механізми дії наночастинок металів

Наночастки металів (NPs), що володіють значними антимікробними властивостями, можуть бути надзвичайно корисними для знищення джерел інфекцій і захворювань [50]. На нанорівні фізико-хімічні та біологічні характеристики наночастинок підсилюються завдяки збільшенню питомої поверхні, рівномірності розподілу та морфології. Антимікробні властивості наночастинок залежать від способу їх синтезу [51].

Дослідження показують [52], що пригнічення або загибель бактеріальних клітин зумовлені взаємодією одного чи кількох механізмів, які залежать від природи та хімічного складу наночастинок металів. Основним механізмом антимікробної дії є утворення активних форм кисню (ROS). Під час цього процесу клітинні мембрани можуть зазнавати пошкодження внаслідок електростатичної взаємодії, порушення гомеостазу металевих іонів, дисфункції білків і ферментів, генотоксичності та програмованої загибелі клітин.

Зазвичай бактерії мають певні структурні особливості, що визначають їхню взаємодію з металевими наночастиками. Обидва типи бактерій (грампозитивні та грамнегативні) мають на клітинній стінці області з від'ємним зарядом [53]. Саме цей від'ємний заряд забезпечує притягнення металевих наночастинок завдяки електростатичним силам.

Крім того, наночастки металів часто мають позитивний заряд на поверхні, що дозволяє їм руйнувати клітинну стінку та підвищувати проникність наночастинок у клітину. Водночас наночастки можуть виділяти позаклітинні іони металів, які проникають усередину клітини та порушують її біологічні процеси [54].

Крім того, наночастки можуть пригнічувати утворення біоплівки завдяки впливу на експресію генів, зокрема у випадку дії наночастинок срібла (Ag) [55]. Загалом, щоб проявити антибактеріальні властивості, наночастки повинні контактувати з бактеріальною клітиною через електростатичні, гідрофобні взаємодії або сили Ван дер Ваальса, [56], а також через взаємодію типу «рецептор–ліганд». Завдяки цьому наночастки можуть проникати крізь клітинну мембрану, накопичуватись у цитоплазмі та впливати на структурно-функціональні властивості мембрани й метаболічні процеси клітини. Після проникнення наночастки взаємодіють із ферментами, рибосомами, ДНК і лізосомами, викликаючи окиснювальний стрес, гетерогенні структурні зміни, підвищення проникності клітинної мембрани, порушення електролітного балансу, пригнічення ферментативної активності, деактивацію білків і зміни в генетичній експресії [57].

Шлях оксидативного стресу

Різні антимікробні дії наночастинок включають пошкодження клітинних мембран шляхом прямого контакту з металевими наночастиками (NPs), інгібування утворення біоплівки, а також утворення вільних радикалів і нерадикальних форм активних форм кисню (Reactive Oxygen Species, ROS). За умов оксидативного стресу вивільнення іонів металів із наночастинок може призводити до генерації ROS.

До таких активних форм кисню належать: пероксиди (O_2^{2-}), супероксиди (O_2^-), гідропероксильні радикали ($HO_2\bullet$), гідроксильні радикали ($HO\bullet$) та синглетний кисень ($^1O_2\bullet$). Серед цих реакцій найважливішим є саме утворення ROS. Коли рівень ROS перевищує буферну здатність клітини, розвивається оксидативний стрес, який може

спричинити перекисне окиснення ліпідів, карбонілювання білків та інактивацію певних ферментів [58].

Крім того, численні дослідження показали, що підвищена проникність клітинної мембрани може бути наслідком оксидативного стресу. Індукований ROS оксидативний стрес відіграє ключову роль у антибактеріальному механізмі дії наночастинок. Утворення ROS може відбуватись через фотокаталітичні процеси, дефектні ділянки кристалічної решітки або ультразвукову активацію. Різні наночастки генерують ROS з різною динамікою. Наприклад, CaO- та MgO-наночастки продукують супероксид-іони (O_2^-), тоді як ZnO-NPs утворюють перекис водню (H_2O_2) та гідроксильні радикали (OH^\cdot). CuO-NPs здатні генерувати всі вищезгадані види ROS. Слабкий стрес, спричинений O_2^- та H_2O_2 , може бути нейтралізований антиоксидантними ферментами, такими як супероксиддисмутаза та каталаза, тоді як сильний оксидативний стрес, викликаний HO^\cdot та O_2 , може призвести до загибелі клітини [59].

Після проникнення всередину клітини наночастки срібла та іони Ag^+ взаємодіють зі структурними компонентами – білками, ліпідами та ДНК, порушуючи їхню функціональність і призводячи до загибелі бактерій.

Вивільнення іонів металів

У цьому механізмі вважається, що іони металів вивільнюються з металевих або металоксидних наночастинок (NPs) і адсорбуються на клітинній мембрані. Згодом вони взаємодіють із функціональними групами нуклеїнових кислот ($-COOH$, $-NH_2$ та $-SH$), що призводить до інактивації ферментів і змін у структурі клітини.

Однак у випадку суспензій металевих оксидів слабка антимікробна активність пояснюється тим, що вивільнені іони металів майже не впливають на рН усередині ліпідних везикул [60].

Наприклад, суперпарамагнітні оксиди заліза (Fe-оксиди) можуть проникати всередину клітинної мембрани, порушуючи передачу електронів у трансмембранних білках. Крім того, важкі іони металів можуть опосередковано виступати переносниками антимікробних компонентів, підсилюючи бактерицидну дію [61].

Неоксидативний шлях

Неоксидативний механізм антибактеріальної дії наночастинок був описаний у дослідженнях, що стосуються наночастинок оксиду магнію (MgO NPs). У ході експериментів MgO NPs не виявлялися всередині клітин під час руйнування клітинної мембрани, проте на поверхні бактерій утворювалися помітні пори, що свідчить про перекисне окиснення ліпідів і руйнування мембранної структури [62]. Це підтверджує, що MgO NPs можуть здійснювати антимікробну дію навіть без безпосередньої участі ROS, тобто за неоксидативним шляхом.

Взаємодія наночастинок із клітинним бар'єром

Компоненти клітинної мембрани відіграють ключову роль у адсорбції наночастинок як на грамнегативних, так і на грампозитивних бактеріях. У грамнегативних бактерій головним структурним елементом

клітинної стінки є ліпополісахариди (ЛПС), які створюють негативно заряджений шар, що притягує позитивно заряджені наночастки. Попри це, деякі дослідження показали, що наночастки можуть проявляти навіть вищу ефективність проти грампозитивних бактерій, ніж проти грамнегативних. Дана різниця пояснюється будовою клітинної стінки: у грамнегативних бактерій вона складніша (містить ліпополісахариди, ліпопротеїни та фосфоліпіди), утворюючи додатковий бар'єр, який обмежує проникнення макромолекул. Натомість у грампозитивних бактерій клітинна стінка складається з тонкого, пористого шару тейхоевих кислот, який дозволяє чужорідним молекулам проникати всередину, що полегшує ушкодження клітин і призводить до їх загибелі [63].

Таким чином, морфологічна та хімічна структура бактеріальної клітини суттєво впливає на ефективність антимікробної дії наночасток.

Експресія метаболічних генів під дією наночасток

Метаболічні шляхи бактерій є складною інтегрованою системою клітинних процесів, тому зміни в метаболічній активності можуть безпосередньо впливати на патогенність бактеріальних клітин.

Зокрема, наночастки MgO і CuO продемонстрували здатність змінювати експресію білків, пов'язаних із азотним метаболізмом бактерій, що призводить до інгібування активності нітрат- та нітритредуктаз [64]. Такий вплив порушує ключові біохімічні процеси, необхідні для росту й виживання бактерій.

Застосування наночасток металів у різних галузях

Наночастки на основі марганцю

Дослідники [65] синтезували наночастки оксиду марганцю (MnO NPs) за допомогою екстракту рослини *A. indicium* («зеленим» методом). Отримані Ai-MnO-NPs показали високу антибактеріальну активність проти *Bacillus subtilis* та *Staphylococcus aureus*, співставну з ефективністю антибіотиків, тоді як сам рослинний екстракт мав лише слабку дію.

Інші дослідники [66] отримали наночастки оксиду марганцю, використовуючи екстракти лимона та куркуміну. Спектроскопічні методи (UV–Vis, FT-IR) підтвердили функціоналізацію поверхні MnO-NPs, а SEM-аналіз показав, що частинки мають сферичну форму розміром 50 ± 5 нм. Отримані NPs проявили антибактеріальну активність проти *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. typhus*, а також протигрибкову дію проти *C. albicans*, *C. lunata* і *T. simii*.

Модифіковані куркумін-аніліном MnO-NPs показали підвищену ефективність у пригніченні росту бактерій, що відкриває перспективи їх використання у створенні нових антимікробних засобів і біомедичних пристроїв [67].

Синтезовані також Mn₃O₄-NPs методом осадження (преципітації). Середній розмір частинок становив 10–30 нм, і вони проявили антибактеріальну активність проти *E. coli* та *S. aureus*, причому *E. coli* була чутливішою до цих наночасток [68].

Окрім цього, нанокompозити на основі графену також показали перспективу як антимікробні матеріали. Так, синтезовані наночастки

фериту марганцю ($MnFe_2O_4$), іммобілізовані на графенових листках ($MnFe_2O_4-G$) [69]. Частинки розміром близько 25 нм рівномірно розподілялися по графену. Композит $MnFe_2O_4-G$ показав вищу антибактеріальну активність проти *E. coli*, ніж окремі $MnFe_2O_4$ -NPs, що свідчить про синергічний ефект між графеном і наночастинками.

Також проведено дослідження нанокompозиту $ZnO/Ag/Mn_2O_3$ (NC), порівняно з окремими компонентами – ZnO , Ag та Mn_2O_3 -NPs. Було встановлено, що синергічний ефект у композиті $ZnO/Ag/Mn_2O_3$ є основною причиною підвищеної антимікробної активності [70].

Це дослідження є особливо важливим, оскільки демонструє можливість використання синергічних ефектів при створенні нових матеріалів не лише для біомедичних, але й для енергетичних і каталізаторних застосувань.

Наночастки на основі заліза

Завдяки високій біосумісності атомів заліза, наночастки на основі оксидів заліза (Fe-oxide NPs) широко застосовуються у терапевтичних цілях та інших біомедичних галузях [71].

Синтезовано [72] FeO-наночастки з використанням водного екстракту кореня *Desmodium gangeticum*. Результати аналізу наночасток показали, що частинки мають сферичну форму розміром 25–35 нм та низький ступінь агрегації. Отримані FeO-NPs продемонстрували антимікробну активність проти *E. coli*, *B. subtilis* і *S. aureus* методом дифузії в агарі. При цьому антимікробний ефект екстракту DG був значно нижчим, ніж у наночасток. Було також встановлено, що бактерії потребують засвоєння іонів Fe^{3+} з подальшим відновленням Fe^{3+} до Fe^{2+} , що відіграє важливу роль у механізмі дії. Іони заліза безпосередньо впливають на бактеріостатичний ефект, регулюючи утворення гідроксильних радикалів, що зумовлює пошкодження клітинних структур.

Отримані також два зразки наночасток оксиду заліза (Fe_3O_4 NPs) з використанням бурих (*C. sinuosa*) та червоних (*P. capillacea*) водоростей [73]. Ці наночастки проявили широкий спектр антибактеріальної активності проти грамнегативних (зона інгібування $8,37 \pm 6,62$ мм) та грампозитивних бактерій ($5,75 \pm 2,25$ мм). Крім того, Fe_3O_4 -NPs, отримані з *C. sinuosa*, показали вищу протигрибкову активність проти *Aspergillus flavus* (9 мм) і *Fusarium oxysporum* (6 мм) порівняно з *P. capillacea* (7 і 5 мм відповідно) та контролем.

Синтезувано також Fe_3O_4 -NPs з використанням екстракту водорості *Kappaphycus alvarezii* методом комбустії (горіння) [74]. Ці наночастки проявили антибактеріальну активність проти *S. aureus* і *E. coli* та були протестовані також за допомогою імпедансних вимірювань. Було встановлено, що метод є економічно вигідним і отримані наночастки можна використовувати для екологічного видалення токсичних барвників із текстильних стоків.

Наночастки на основі кобальту

Дослідники [75] синтезували наночастки оксиду кобальту (Co_3O_4 NPs) та контролювали їхній розмір, утримуючи його менше ніж 100 нм. Результати досліджень антимікробної активності показали, що Co_3O_4 -NPs чинять значний вплив на *S. aureus* та *E. coli*, що супроводжується помітними змінами зовнішньої мембрани грампозитивних бактерій, зумовленими вивільненням іонів кобальту (Co^{2+}).

Науковці [76] запропонували ймовірний механізм антимікробної дії феритів CoFe_2O_4 NPs. Результати вказують на здатність цих наночастинок знищувати як грампозитивні, так і грамнегативні клітини, оскільки обидва типи мають негативно заряджені клітинні стінки, що полегшує електростатичну взаємодію з наночастинами. Основний механізм дії CoFe_2O_4 NPs полягає у генерації активних форм кисню (ROS). Вважається, що окислювальний стрес спричиняє вивільнення цитоплазматичних компонентів (цукрів, білків) і пошкодження клітинної мембрани, що, у свою чергу, призводить до порушення мітохондріальної активності та загибелі клітин [77]. Було також встановлено, що грамнегативні бактерії є більш чутливими до CoFe_2O_4 -NPs, що пояснюється структурними особливостями їх клітинної стінки: вона містить ліпополісахаридний зовнішній шар, а пептидоглікановий прошарок є тоншим і менш жорстким, тому легше руйнується [78]. Попри це, точний механізм антимікробної дії CoFe_2O_4 -NPs досі остаточно не з'ясований. Результати експериментів свідчать, що витік внутрішньоклітинної рідини у всіх досліджених зразках може бути спричинений порушенням цілісності клітинної оболонки бактерій [79].

Синтезовано також сферичні наночастки кобальту з водних та метанольних екстрактів листя *Morus indica* (тутове дерево) [80]. Середній розмір наночастинок становив 54–125 нм, і вони були отримані за допомогою «зеленого синтезу». Результати показали, що такі Co-NPs мають високу антибактеріальну активність і є перспективними для біомедичних застосувань.

Досліджують також і змішані наноконкомпозити $\text{Mn}_{0.75}\text{Co}_{0.25}\text{Fe}_2\text{O}_4$ [81]. Результати антимікробних випробувань продемонстрували, що найефективнішою композицією є $\text{Zn}_{0.75}\text{Co}_{0.25}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (20 ppm), яка проявила найвищу активність проти *S. aureus*, *E. colymbae* і *A. viridians*.

Наночастки на основі міді

Наночастки на основі хітозану та міді (chitosan–Cu NPs), отримані хімічним методом, мають розмір частинок 200–350 нм [82]. Проведені антимікробні дослідження проти *S. choleraesuis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* та *B. subtilis* показали, що такі наночастки мають потенційне застосування у фармацевтичній та біомедичній галузях.

Встановлено [52], що CuO-наночастки ефективні проти *K. pneumoniae*, *S. typhimurium* та *E. aerogenes*. Мінімальна інгібуюча концентрація (MIC) для цих трьох грамнегативних штамів становила 0,55; 0,15 та 0,30 мкг/мл відповідно, що свідчить про потужну бактерицидну активність CuO-NPs.

Висунуто гіпотезу [83], що наночастки атакують бактеріальні клітини за кількома механізмами, зокрема через генерацію активних форм кисню (ROS), які спричиняють руйнування клітинної мембрани. У цьому випадку прямий контакт із мембраною сприяє утворенню іонів металу, що порушують електронно-транспортний ланцюг і процеси метаболічного контролю бактерій.

Отримані методом осадження наночастки оксиду міді (CuO NPs) [84] та характеризуються середнім розміром частинок за TEM і XRD 23 нм. Ці наночастки показали високу антимікробну активність проти різних бактеріальних штампів, причому *E. coli* та *E. faecalis* виявили найбільшу чутливість.

Також синтезовано CuO-NPs з листя *Eichhornia crassipes* (водяний гіацинт) [85]. Методи XRD, FT-IR, UV-Vis, SEM та EDX підтвердили розмір частинок у межах 20–25 нм. Отримані наночастки продемонстрували високу антибактеріальну активність проти *S. pneumoniae*, *S. aureus* та *K. pneumoniae*.

Було синтезовано CuO-NPs, які показали значну антимікробну ефективність проти збудників карієсу, хоча продемонстрували слабшу дію проти трьох видів *Candida* [86]. Таким чином, ці наночастки можуть бути перспективними агентами для профілактики стоматологічних інфекцій.

Синтез CuO-NPs та ZnO NPs методом вологого хімічного відновлення [87] дозволяє отримати ZnO-NPs сферичної форми (розміром близько 15 нм), а CuO-NPs форми нанострижнів (nanorods). Дослідження антимікробної активності продемонструвало, що CuO-NPs мають кращу антибактеріальну дію порівняно з ZnO-NPs, особливо проти *S. aureus* та *E. coli*.

Наночастки на основі цинку

Методом золь-гель за низької температури з подальшим відпалом при 400 і 550 °C синтезовано наночастки оксиду цинку (ZnO-NPs) [88]. Отримані наночастки були охарактеризовані за допомогою XRD, TEM та FT-IR. Результати TEM продемонстрували гексагональну структуру з розміром зерен 38–43 нм.

Науковці [89] вважають, що грамнегативні бактерії є більш чутливими до антимікробних агентів, ніж грампозитивні. Це пояснюється тим, що клітинна стінка грампозитивних бактерій має щільний шар пептидоглікану, який підвищує їхню стійкість, тоді як грамнегативні бактерії мають тонкий пептидоглікановий шар, який полегшує проникнення іонів металів і наночасток у клітину. Крім того, негативно заряджений ліпополісахаридний шар грамнегативних бактерій [90] відіграє важливу роль у взаємодії з позитивно зарядженими іонами металів, що призводить до внутрішньоклітинних ушкоджень, деградації ДНК та білків [91]. Синтезовано [92] ZnO-NPs розміром близько 30 нм. Антимікробну активність оцінено методом дискової дифузії, який показав, що ZnO-NPs ефективно пригнічують ріст карбапенем-резистентного штаму *A. baumannii*. Передбачуваний механізм дії ZnO полягає у генерації активних форм кисню (ROS), що спричиняють перекисне окиснення ліпідів мембрани, втрату

цукрів, ДНК, білків і порушення клітинного метаболізму [93]. Ці результати показують, що ZnO-NPs можуть розглядатись як альтернативний терапевтичний засіб проти інфекцій, викликаних *A. baumannii* [94].

Наночастки титану

Наноструктури титану демонструють значний потенціал у галузі переробки та безпеки харчових продуктів завдяки своїй низькій вартості, хімічній стабільності, фотокаталітичній активності та біосумісності, а також антимікробним властивостям.

Передбачається, що антимікробна активність Ti-NPs зумовлена утворенням активних форм кисню (ROS) [95]. Останнім часом особливу увагу приділяють композитам на основі TiO₂-NPs та хітозану. Так, було застосовано нанокompозит хітозан/PVA/TiO₂-NP як пакувальний матеріал для м'якого білого сиру, що забезпечило підвищений термін зберігання та зменшення кількості бактерій, дріжджів і пліснявих грибів порівняно з контролем [96]. Інший варіант хітозанової плівки, яка була виготовлена із ефірною олією лимонної трави (*Symborogon citratus*) (CCEO) та TiO₂-NPs, використали для пакування м'ясного фаршу, який зберігали за температури 4 °C упродовж 10 днів. Включення TiO₂-NPs сприяло зростанню проникності для водяної пари та міцності на розрив, тоді як додавання CCEO подовжило термін придатності м'яса [97].

У нещодавньому огляді щодо композитів PLA/TiO₂ було проаналізовано методи покращення дисперсії TiO₂ і властивостей композитів; зроблено висновок, що ці матеріали є перспективними для застосування в пакуванні харчових продуктів [98]. Було також оцінено ефективність їстівних нанокompозитних плівок, що складаються з ізоляту сироваткового білка/нановолокна целюлози з TiO₂ та ефірною олією розмарину, у збереженні мікробіологічної та сенсорної якості баранини при зберіганні за температури 4 °C. Встановлено, що ці плівки демонструють вищу інгібуючу активність проти грампозитивних бактерій, ніж проти грамнегативних.

Харчова промисловість

Більшість застосувань наночасток металів (MNPs) в аграрному секторі та харчовій промисловості спрямовані на покращення органолептичних властивостей харчових продуктів (смак, колір, текстура), підвищення засвоюваності поживних речовин, цільову доставку біологічно активних сполук, стабілізацію активних інгредієнтів, а також забезпечення антимікробної дії проти патогенів, що викликають харчові інфекції.

Багато застосувань пов'язані з інноваціями у сфері пакувальних матеріалів, які сприяють збереженню якості продуктів та подовженню терміну їхнього зберігання.

Крім того, MNPs використовують як сенсори для моніторингу якості та безпеки харчових продуктів [99].

Основні напрями використання MNPs:

- розробка антимікробних агентів, здатних подовжувати термін зберігання продуктів і запобігати мікробному росту. MNPs можуть

руйнувати клітини мікроорганізмів різними механізмами, зокрема мають потенціал інгібувати утворення біоплівки. Ця антимікробна ефективність залежить від методу синтезу MNPs, їх розміру, форми, типу металу та характеру стабілізуючих агентів [100];

- розробка активних, «розумних» або біорозкладних пакувальних матеріалів з поліпшеними властивостями, зокрема:
 - ультрафіолетовим захистом і антимікробною активністю,
 - підвищеною термостійкістю, гідрофобністю, низькою паропроникністю та бар'єрними властивостями щодо кисню,
 - здатністю змінювати колір продукту,
 - високою активністю у зв'язуванні радикалів і кисню,
 - покращеними механічними властивостями (міцність на розрив, товщина, прозорість, гнучкість, стабільність до перепадів температури та вологи) [101].

Функціональні наноматеріали для покращеного пакування можна класифікувати на чотири основні категорії [102]:

1. Фізично вдосконалене пакування – підвищена механічна міцність, термо- та вологостійкість, газонепроникність, гнучкість і довговічність.

2. Біохімічно вдосконалене пакування – покращена біорозкладність, їстівність, біосумісність, екологічність і мінімізація відходів.

3. Активне пакування – взаємодія з продуктом для покращення смаку, свіжості та подовження терміну зберігання.

4. «Розумне» пакування – оснащене наносенсорами, здатними контролювати стан продукту (рівень кисню, ступінь свіжості, наявність патогенів тощо).

Енергетика та екологія

Наночастки металів і їх оксидів відіграють ключову роль у розвитку сучасних енергетичних та екологічних технологій. Вони демонструють високу каталітичну активність, здатність до перетворення енергії, а також ефективність у процесах очищення навколишнього середовища. Зокрема, наночастки TiO_2 , ZnO , Fe_2O_3 , CuO та інших металів широко використовують у фотокаталізі для деградації органічних барвників, пестицидів і фармацевтичних залишків у воді [103]. Завдяки своїй великій питомій поверхні й активним центрам вони забезпечують інтенсивне утворення активних форм кисню (ROS), що окислюють забруднювачі до безпечних сполук [104].

Окрім цього, MNPs активно застосовують у паливних елементах, водневій енергетиці та системах накопичення енергії, де вони слугують ефективними каталізаторами для реакцій окиснення водню, метанолу або етанолу. Такі матеріали сприяють підвищенню енергетичної ефективності, зниженню вартості елементів та заміні рідкісних металів (наприклад, платини) на доступніші альтернативи, як-от сплави Ni-Cu або Co-Fe [105].

Також MNPs застосовують в технологіях очищення води, зокрема у фотокаталітичних реакторах для дезінфекції та видалення стійких органічних сполук. Завдяки магнітним властивостям Fe_3O_4 NPs їх можна легко відокремити з очищеної води, що робить процес економічно й екологічно ефективним [104].

Шкіряна промисловість

Використання наночасток металів у шкіряній промисловості спрямоване на функціоналізацію матеріалів для надання їм антибактеріальних, антимікотичних, антистатичних, водовідштовхувальних та UV-захисних властивостей [106]. Наночастки срібла (AgNPs), міді (CuNPs) та цинку (ZnNPs) інтегруються в структуру волокон або покриттів, забезпечуючи тривалий антибактеріальний ефект без втрати гнучкості чи блиску матеріалу [107].

У шкіряній галузі наночастки використовують у процесах дублення, фарбування та оздоблення, що сприяє зменшенню кількості токсичних реагентів (наприклад, хромових сполук) і підвищенню екологічності виробництва. Додавання наночасток у фінішні покриття покращує механічну міцність, стійкість до вологи, УФ-випромінювання та стирання [108]. Крім того, створюються нанокомпозити на основі полімерів і наночасток металів, які підвищують адгезію барвників, рівномірність кольору та блиск шкіри. Такі наноструктуровані покриття мають підвищену біосумісність і можуть бути використані в еко-шкірі для взуття, меблів і автомобільних салонів [107].

Парні шкіри та шкіри є органічними матеріалами, схильними до гниття, якщо їх не зберігати за допомогою відповідних консервантів. У світі застосовується кілька методів консервування, таких як висушування, мокросоління, сухосоління та пікелювання. Крім того, існують фізичні безсолеві методи консервування, серед яких – опромінення γ -променями, охолодження та вакуумне пакування [109]. Однак широке застосування цих методів обмежується високими капітальними витратами, складністю технологічних параметрів, вартістю обладнання, можливим пошкодженням колагенової структури та утворенням тріщин на поверхні шкір. Найпоширенішим способом консервування є використання кухонної солі (NaCl). Проте при традиційному консервуванні у стічні води потрапляє велика кількість хлоридів (Cl^-), розчинених твердих речовин, а також спостерігається підвищений рівень біологічного та хімічного споживання кисню [110]. Для ефективного консервування необхідно 40–50 % солі від маси парної шкіри, при цьому близько 17 % солі залишається у шкірі, а решта потрапляє у стічні води, підвищуючи навантаження на довкілля [111]. Хоча NaCl є дешевим консервантом, такий метод супроводжується викидом високих концентрацій розчинених солей (понад 2100 ppm) і до 55 % хлоридів у стічних водах [112].

Нещодавнє дослідження Мутукрішнана та Рамакрішнана продемонструвало високі антимікробні та консервувальні властивості наночасток срібла на основі галової кислоти (GA-AgNPs) [113].

Наночастки срібла були синтезовані додаванням різних концентрацій AgNO_3 до відновника – галової кислоти (GA) при безперервному перемішуванні за кімнатної температури [114]. Отримані GA-AgNPs були охарактеризовані за допомогою методів UV-Vis, XRD та SEM.

Крім наночасток срібла, для консервування шкіряної сировини ефективно використовують й інші наноматеріали, зокрема оксид цинку (ZnO), діоксид титану (TiO_2), хлорид цинку (ZnCl_2), оксид срібла (Ag_2O) та їх композити. Інші наноматеріали, що володіють вираженими антимікробними властивостями, включають SiO_2 , MgO, Al_2O_3 , CuO, Fe_3O_4 , TiO_2 і ZnO, які можуть слугувати екологічною альтернативою традиційному консервуванню хлоридом натрію [115].

Застосування наночасток у консервуванні шкіур забезпечує мінімальне збільшення їхньої ваги, але суттєво покращує хімічні та фізичні властивості готової шкіри, полегшує повторне зволоження під час відмочування і зоління, забезпечує високу антимікробну активність, зменшує забруднення стічних вод і може бути економічно вигідним за умови масового виробництва [116].

На початковому етапі обробки шкіур застосовують процес зоління, який передбачає використання розчину, що містить сірчистий натрій (Na_2S), вапно ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) та допоміжні речовини, які розпушують волокнисту структуру, розщеплюють фібрилярні пучки, омилюють жири, видаляють кератинові білки (волосяний покрив) та руйнують міжфібрилярні білки. Традиційний процес зоління супроводжується значним екологічним навантаженням, яке становлять 60–70 % загального обсягу забруднення від шкіряних виробництв [117]. З метою зменшення екологічного навантаження дослідники вивчили можливість застосування ZnNPs з іммобілізованою протеазою як екологічної альтернативи традиційному зневолошуванню у підготовчих процесах виробництва натуральної шкіри. Для синтезу наночасток гексаметилентетрамін та ZnO змішували з поступовим додаванням NaOH до досягнення $\text{pH} \approx 10$, при безперервному перемішуванні. Після 3 годин реакції утворений білий осад промивали дистильованою водою і прожарювали за температури $300\text{ }^\circ\text{C}$ упродовж 4 годин [118]. Для створення нанобіокатализатора PEG-модифікований ZnO диспергували у воді, після чого додавали 2 мг/л ферменту протеази. Одержаний осад центрифугували та промивали для подальшого використання [119]. Пастоподібну масу (з додаванням 30 % води) наносили на міздряний бік шкіур у кількості 10 г/кг і витримували 16 годин. Застосування нанобіокатализатора забезпечило більш ефективніше видалення шерсті, ніж традиційна система з використанням вапна та сірководню на процесі зневолошування-зоління. Ферментативна дія нанобіокатализатора була селективною до неколагенових білків, сприяючи руйнуванню протеогліканів у волосяному стрижні та забезпечуючи повне зневолошування. Для ділянок з густою шерстю (спина, шия) використовували 1 % катализатора від маси парної шкіри. Фізико-механічні показники обробленої нанокатализатором шкіри становили: границя

міцності при розтягуванні – 28 ± 2 МПа, видовження при розриві – $36 \pm 4\%$, міцність лицьового шару шкіри – 25 МПа. Зразки, оброблені ZnO-протеазними нанокатализаторами, виявили вищу стійкість до мікробного ураження і потребували на 33% менше ферменту, ніж комерційні аналоги, завдяки підвищеній спорідненості ферменту до неколагенових білків. Крім того, при цьому не спостерігалось неприємного запаху або побічних змін, характерних для традиційних методів [120].

Шкіра є універсальним матеріалом, який використовується для виготовлення одягу, взуття, галантереї та автомобільних сидінь. Під час експлуатації вона контактує з тілом людини, потом і зовнішнім середовищем, тому може створювати несприятливі мікробіологічні умови – розвиток цвілі, грибів і бактерій, особливо якщо не має антибактеріальних властивостей. Традиційно для запобігання цим проблемам у взуттєвій шкірі застосовували фунгіцид 2-тіоціанометилтіо-бензотіазол, однак він є токсичним і алергенним [121].

Досліджено антибактеріальні покриття на основі наночасток TiO_2 та Ag. Додавання іонів срібла (Ag) до наночасток діоксиду титану (TiO_2) утворює композити з потужними антибактеріальними та антимікотичними властивостями, навіть при низьких концентраціях [122]. Синтезовані Ag– TiO_2 наноматеріали методом sol–gel наносили на поверхню шкіряних матеріалів з витратою 5 %. Випробування проти *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* та *E. coli* показали 93,5–99,98 % пригнічення росту мікроорганізмів. Отже, Ag– TiO_2 може ефективно використовуватися як антибактеріальне фінішне покриття для підкладкової та інших видів шкіри.

Сполуки міді (Cu) також знайшли застосування у фінішній обробці завдяки дрібнодисперсності та високій реакційній здатності [123]. Cu отриманий методом хімічного відновлення, для якого $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ змішували з аскорбіновою кислотою, NaBH_4 та стабілізатором полівінілпіролідом. Додавання CuNPs (0,25–5 г) до базового та верхнього шару покриття разом з акриловими полімерами, білковими зв'язуючими та пігментами підвищило адгезію покриття до шкіри, стійкість до вологого та сухого тертя, водостійкість і стійкість до механічного впливу [124].

Традиційні бактерициди для шкіряних матеріалів часто містять леткі органічні сполуки, фенольні та гетероциклічні компоненти, що є токсичними для довкілля та людини [125]. Досліджено також можливість застосування Ag– TiO_2 наночасток у просочувальному та закріплювальному шарах фінішного покриття на шкірі, дубленій глутаровим альдегідом і синтетичним дубителем. Оброблені вказаними наночастками зразки продемонстрували виражену антибактеріальну активність проти *S. aureus*, *P. aeruginosa* та *C. albicans* при низькій цитотоксичності, що підтверджує їх придатність для застосування.

Також створене антибактеріальне полімерне покриття з інкапсульованими AgNPs для автомобільної шкіри [126]. Таке покриття

забезпечує 99 % пригнічення росту *E. coli* та на 97% пригнічення *A. niger*, демонструючи тривалий ефект та високу адгезію.

Шкіряні матеріали рослинного дублення має гідрофільну природу, схильна до вбирання вологи і швидкого намокання, що сприяє росту грибів. Традиційне жирування знижує водопоглинання, але часто зменшує паропроникність – одну з основних гігієнічних властивостей натуральної шкіри. Цікавим з огляду на це є експерименти по підвищенню рівня гідрофобності натуральних шкіряних матеріалів за допомогою $\text{TiO}_2\text{-SiO}_2$ нанопокриттів, нанесених на активовану плазмою поверхню[127].

Використання наноматеріалів у фінішній обробці шкіри дозволяє: надати антибактеріальні, гідрофобні, вогнестійкі та самоочищувальні властивості; підвищити естетичні та експлуатаційні властивості; сприяє зменшенню токсичних викидів і заміні шкідливих хімічних матеріалів.

Отже, нанотехнології у фінішних покриттях – це інноваційний напрям, що поєднує функціональність, безпечність і довговічність шкіри, відкриваючи перспективи для створення «розумних» шкіряних матеріалів нового покоління. Шкіряна промисловість є одним із найстаріших і водночас найважливіших секторів світової економіки, який забезпечує продукцію з високими естетичними та функціональними властивостями. Проте цей сектор є значним джерелом екологічного навантаження, адже до 80 % сировини перетворюється на відходи, а процеси дублення та обробки спричиняють значні викиди парникових газів. Впровадження нанотехнологій відкриває шлях до досягнення вуглецевої нейтральності (net zero) у шкіряній галузі завдяки підвищенню ефективності технологічних процесів, зниженню споживання води, енергії та хімічних реагентів, а також мінімізації відходів. Таким чином, наноматеріали виступають ключовим інструментом переходу шкіряного виробництва до екологічно безпечних та сталих технологій.

Висновки. У результаті наведеного у роботі аналізу встановлено, що наночастки є ефективним інструментом підвищення якості та функціональності матеріалів різних галузей виробництва та сфери охорони здоров'я. Завдяки своїм унікальним фізико-хімічним властивостям наночастки здатні надавати матеріалам широкий спектр антимікробних властивостей. На особливу увагу заслуговує застосування «зелених» (біологічних) методів синтезу наночасток, які дозволяють мінімізувати токсичність, знизити витрати енергії та зменшити негативний вплив на довкілля. Використання таких екологічно безпечних та ресурсощадних технологій відповідає сучасним вимогам сталого розвитку та екологізації промислових процесів. Дослідження у сфері синтезу наночасток мають бути спрямовані на оптимізацію вказаних методів, підвищення стабільності наноматеріалів та всебічне вивчення їх впливу на навколишнє середовище і здоров'я людини з точки зору їх безпечності.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Rana A., Yadav K., Jagadevan S. A comprehensive review on green synthesis of nature-inspired metal nanoparticles: mechanism, application and toxicity. *Journal of Cleaner Production*. 2020. Vol. 272. Art. 122880;
2. Machado S., Pacheco J. G., Nouws H. P. A., Albergaria J. T., Delerue-Matos C. Characterization of green zero-valent iron nanoparticles produced with tree leaf extracts. *Science of the Total Environment*. 2015. Vol. 533. P. 76–81;
3. Talarska P., Boruckowski M., Zurawski J. Current knowledge of silver and gold nanoparticles in laboratory research: application, toxicity, cellular uptake. *Nanomaterials*. 2021. Vol. 11. Art. 2454;
4. Modena M. M., Ruhle B., Burg T. P., Wuttke S. Nanoparticle characterization: what to measure. *Advanced Materials*. 2019. Vol. 31. Art. 1901556;
5. Yaqoob S. B., Adnan R., Khan R. M. R., Rashid M. Gold, silver, and palladium nanoparticles: a chemical tool for biomedical applications. *Frontiers in Chemistry*. 2020. Vol. 8. Art. 376;
6. Loiseau A., Asila V., Boitel-Aullen G., Lam M., Salmain M., Boujday S. Silver-based plasmonic nanoparticles and their use in biosensing. *Biosensors*. 2019. Vol. 9. Art. 78;
7. Khan A., Rashid R., Murtaza G., Zahra A. Gold nanoparticles: synthesis and applications in drug delivery. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2014. Vol. 13. P. 1169—1176.
8. Paduraru D. N., Ion D., Niculescu A. G., Muşat F., Andronic O., Grumezescu A. M., Bolocan A. Recent developments in metallic nanomaterials for cancer therapy, diagnosing and imaging applications. *Pharmaceutics*. 2022. Vol. 14. Art. 435;
9. Heinemann M. G., Rosa C. H., Rosa G. R., Dias D. Biogenic synthesis of gold and silver nanoparticles used in environmental applications: a review. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*. 2021. Vol. 30. Art. e00129;
10. Ealia S. A. M., Saravanakumar M. P. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 2017. Vol. 263. Art. 032019;
11. Khan Y., Sadia H., Shah S. Z. A., Khan M. N., Shah A. A., Ullah N., Ullah M. F., Bibi H., Bafakeeh O. T., Khedher N. B. et al. Classification, synthetic, and characterization approaches to nanoparticles, and their applications in various fields of nanotechnology: a review. *Catalysts*. 2022. Vol. 12. Art. 1386;
12. Esakkimuthu T., Sivakumar D., Akila S. Application of nanoparticles in wastewater treatment. *Pollution Research*. 2014. Vol. 33. P. 567–571;
13. Ahmad Z., Shah A., Siddiq M., Kraatz H. B. Polymeric Micelles as Drug Delivery Vehicles. *RSC Adv*. 2014. Vol. 4. P. 17028–17038;
14. Buse J., El-Aneed A. Properties, Engineering and Applications of Lipid-Based Nanoparticle Drug-Delivery Systems: Current Research and Advances. *Nanomedicine*. 2010. Vol. 5. P. 1237–1260;
15. Daraee H., Etemadi A., Kouhi M., Alimirzalu S., Akbarzadeh A. Application of liposomes in medicine and drug delivery. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol*. 2016. Vol. 44. P. 381–391;
16. Oberholzer T., Luisi P.L. The use of liposomes for constructing cell models. *J. Biol. Phys.* 2002. Vol. 28. P. 733–744;
17. Mitchell M.J., Billingsley M.M., Haley R.M., Wechsler M.E., Peppas N.A., Langer R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2021. Vol. 20. P. 101–124;
18. Hsu H., Bugno J., Lee S., Hong S. Dendrimer-based nanocarriers: a versatile platform for drug delivery. *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol*. 2017. Vol. 9;

19. Palmerston Mendes L., Pan J., Torchilin V.P. Dendrimers as nanocarriers for nucleic acid and drug delivery in cancer therapy. *Molecules*. 2017. Vol. 22. 1401;
20. Spirescu V.A., Chircov C., Grumezescu A.M., Andronescu E. Polymeric nanoparticles for antimicrobial therapies: an up-to-date overview. *Polymers*. 2021. Vol. 13. P. 724;
21. Vardaxi A., Kafetzi M., Pispas S. Polymeric nanostructures containing proteins and peptides for pharmaceutical applications. *Polymers*. 2022. Vol. 14. P. 777;
22. Batista F.A., Fontele S.B.C., Santos L.K.B., Filgueiras L.A., Nascimento S.Q., Sousa J.M.C., Goncalves J.C.R., Mendes A.N. Synthesis, characterization of terpineol-loaded PMMA nanoparticles as proposed therapy for melanoma. *Mater. Today Commun.* 2020. Vol. 22. 100762;
23. Aljabali A.A., Rezigue M., Alsharedeh R.H., Obeid M.A., Mishra V., Serrano-Aroca A., El-Tanani M., Tambuwala M.M. Protein-based nanomaterials: a new tool for targeted drug delivery. *Ther. Deliv.* 2022. Vol. 13. P. 321–338;
24. Hong S., Choi D.W., Kim H.N., Park C.G., Lee W., Park H.H. Protein-based nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmaceutics*. 2020. Vol. 12. P. 604;
25. Aleman J.V., Chadwick A.V., He J., Hess M., Horie K., Jones R.G., Kratochvíl P., Meisel I., Mita I., Moad G., et al. Definitions of terms relating to the structure and processing of sols, gels, networks, and inorganic-organic hybrid materials (IUPAC recommendations 2007). *Pure Appl. Chem.* 2007. Vol. 79. P. 1801–1829;
26. Chen H., Zhang H., Sun P., Song X., Zhang Y. Nanostructured materials for drug delivery: latest advances and future perspectives. *J. Mater. Chem. B*. 2023. Vol. 11. P. 3955–3978;
27. Liu Y., Sun Q., Wang J. Recent advances of green-synthesized nanoparticles in biomedical applications. *J. Nanobiotechnol.* 2022. Vol. 20. P. 45;
28. Salavati-Niasari M., Davar F., Mir N. Synthesis and characterization of metallic copper nanoparticles via thermal decomposition. *Polyhedron*. 2008. Vol. 27. P. 3514–3518;
29. Vargas-Ortiz J.R., Gonzalez C., Esquivel K. Magnetic iron nanoparticles: synthesis, surface enhancements, and biological challenges. *Processes*. 2022. Vol. 10;
30. Le N., Zhang M., Kim K. Quantum dots and their interaction with biological systems. *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23;
31. Bruckmann F.d.S., Nunes F.B., Salles T.d.R., Franco C., Cadona F.C., Rhoden C.R.B. Biological applications of silica-based nanoparticles. *Magnetochemistry*. 2022. Vol. 8;
32. Shahmoradi S., Shariati A., Amini S.M., Zargar N., Yadegari Z., Darban-Sarokhalil D. Application of selenium nanoparticles for enhancing the efficacy of photodynamic inactivation of *Streptococcus mutans*. *BMC Res. Notes*. 2022. Vol. 15;
33. Vines J.B., Yoon J.-H., Ryu N.-E., Lim D.-J., Park H. Gold nanoparticles for photothermal cancer therapy. *Front. Chem.* 2019. Vol. 7;
34. Koga K., Tagami T., Ozeki T. Gold nanoparticle-coated thermosensitive liposomes for triggered release of doxorubicin and photothermal therapy using near-infrared laser. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 2021. Vol. 626;
35. Koosha F., Farsangi Z.J., Samadian H., Amini S.M. Mesoporous silica-coated gold nanorods: a multifunctional theranostic platform for radiotherapy and X-ray imaging. *J. Porous Mater.* 2021. Vol. 28. P. 1961–1968;
36. Pangli H., Vatanpour S., Hortamani S., Jalili R., Ghahary A. Incorporation of silver nanoparticles in hydrogel matrices for controlling wound infection. *J. Burn Care Res.* 2021. Vol. 42. P. 785–793;

37. Bhaviripudi S., Mile E., Steiner S.A., Zare A.T., Dresselhaus M.S., Belcher A.M., Kong J. CVD synthesis of single-walled carbon nanotubes from gold nanoparticle catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* 2007. Vol. 129. P. 1516–1517;
38. Nasrollahzadeh M., Issaabadi Z., Sajjadi M., Sajadi S.M., Atarod M. Types of nanostructures. *Interface Sci. Technol.* 2019. P. 29–80;
39. Gaur M., Misra C., Yadav A.B., Swaroop S., Maolmhuaidh F., Bechelany M., Barhoum A. Biomedical applications of carbon nanomaterials: fullerenes, quantum dots, nanotubes, nanofibers, and graphene. *Materials.* 2021. Vol. 14;
40. Geim A.K. Graphene: status and prospects. *Science.* 2009. Vol. 324. P. 1530–1534;
41. Behzadi S., Serpooshan V., Tao W., Hamaly M.A., Alkawareek M.Y., Dreaden E.C., Brown D., Alkilany A.M., Farokhzad O.C., Mahmoudi M. Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. *Chem. Soc. Rev.* 2017. Vol. 46. P. 4218–4244;
42. Yadav D., Amini F., Ehrmann A. Recent advances in carbon nanofibers and their applications - a review. *Eur. Polym. J.* 2020. Vol. 138. 109963;
43. Fan Y., Fowler G.D., Zhao M. The past, present and future of carbon black as a rubber reinforcing filler - a review. *J. Clean. Prod.* 2020. Vol. 247. 119115;
44. Silva L.P., Reis I.G., Bonatto C.C. Green synthesis of metal nanoparticles by plants: current trends and challenges. *Green Process. Nanotechnol.* 2015. P. 259–275;
45. Ying S., Guan Z., Ofoegbu P.C., Clubb P., Rico C., He F., Hong J. Green synthesis of nanoparticles: current developments and limitations. *Environ. Technol. Innov.* 2022. Vol. 26. 102336;
46. Krishnia L., Thakur P., Thakur A. Synthesis of nanoparticles by physical route. In: *Synthesis and Applications of Nanoparticles*. Singapore: Springer Nature, 2022. P. 45–59;
47. Biswas A., Bayer I.S., Biris A.S., Wang T., Dervishi E., Faupel F. Advances in top-down and bottom-up surface nanofabrication: techniques, applications & future prospects. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2012. Vol. 170. P. 2–27;
48. Abid N., Khan A.M., Shujait S., Chaudhary K., Ikram M., Imran M., Haider J., Khan M., Khan Q., Maqbool M. Synthesis of nanomaterials using various top-down and bottom-up approaches, influencing factors, advantages, and disadvantages: a review. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2022. Vol. 300;
49. Ali A., Shah T., Ullah R., Zhou P., Guo M., Ovais M., Tan Z., Rui Y. Review on recent progress in magnetic nanoparticles: synthesis, characterization, and diverse applications. *Front. Chem.* 2021. Vol. 9;
50. Youssef A.M., Assem F.M., Abdel-Aziz M.E., Elaaser M., Ibrahim O.A., Mahmoud M., Abd El-Salam M.H. Development of bionanocomposite materials and its use in coating of Ras cheese. *Food Chem.* 2019. Vol. 270. P. 467–475;
51. Vimbela G.V., Ngo S.M., Frazee C., Yang L., Stout D.A. Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials. *Int. J. Nanomed.* 2017. Vol. 12;
52. Singh A., Gautam P.K., Verma A., Singh V., Shivapriya P.M., Shivalkar S., Sahoo A.K., Samanta S.K. Green synthesis of metallic nanoparticles as effective alternatives to treat antibiotic-resistant bacterial infections: a review. *Biotechnol. Rep.* 2020. Vol. 25;
53. Chandrasekaran R., Gnanasekar S., Seetharaman P., Keppanan R., Arockiaswamy W., Sivaperumal S. Formulation of *Carica papaya* latex-functionalized silver nanoparticles for improved antibacterial and anticancer applications. *J. Mol. Liq.* 2016. Vol. 219. P. 232–238;
54. Ingale A.G., Chaudhari A. Biogenic synthesis of nanoparticles and potential applications: an eco-friendly approach. *J. Nanomed. Nanotechnol.* 2013. Vol. 4. P. 1–7;

55. Gao W., Thamphiwatana S., Angsantikul P., Zhang L. Nanoparticle approaches against bacterial infections. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2014. Vol. 6. P. 532–547;
56. Malka E., Perelshtein I., Lipovsky A., Shalom Y., Naparstek L., Perkas N., Patick T., Lubart R., Nitzan Y., Banin E. Eradication of multi-drug resistant bacteria by a novel Zn-doped CuO nanocomposite. *Small.* 2013. Vol. 9. P. 4069–4076;
57. Li Y., Zhang W., Niu J., Chen Y. Mechanism of photogenerated reactive oxygen species and correlation with the antibacterial properties of engineered metal-oxide nanoparticles. *ACS Nano.* 2012. Vol. 6. P. 5164–5173;
58. Alavi M., Yarani R. ROS and RNS modulation: the main antimicrobial, anticancer, antidiabetic, and antineurodegenerative mechanisms of metal or metal oxide nanoparticles. *Nano Micro Biosyst.* 2023. Vol. 2. P. 22–30;
59. Alavi M., Hamblin M.R., Kennedy J.F. Antimicrobial applications of lichens: secondary metabolites and green synthesis of silver nanoparticles: a review. *Nano Micro Biosyst.* 2022. Vol. 1. P. 15–21;
60. Yu J., Zhang W., Li Y., Wang G., Yang L., Jin J., Chen Q., Huang M. Synthesis, characterization, antimicrobial activity and mechanism of a novel hydroxyapatite whisker/nano zinc oxide biomaterial. *Biomed. Mater.* 2014. Vol. 10;
61. Hussein-Al-Ali S.H., El Zowalaty M.E., Hussein M.Z., Geilich B.M., Webster T.J. Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of an ampicillin-conjugated magnetic nanoantibiotic for medical applications. *Int. J. Nanomed.* 2014. Vol. 9. P. 3801–3815;
62. Leung Y.H., Ng A.M., Xu X., Shen Z., Gethings L.A., Wong M.T., Chan C.M., Guo M.Y., Ng Y.H., Djuricic A.B. Mechanisms of antibacterial activity of MgO: non-ROS mediated toxicity of MgO nanoparticles towards *Escherichia coli*. *Small.* 2014. Vol. 10. P. 1171–1183;
63. Lesniak A., Salvati A., Santos-Martinez M.J., Radomski M.W., Dawson K.A., Aberg C. Nanoparticle adhesion to the cell membrane and its effect on nanoparticle uptake efficiency. *J. Am. Chem. Soc.* 2013. Vol. 135. P. 1438–1444;
64. Padmavathy N., Vijayaraghavan R. Interaction of ZnO nanoparticles with microbes - a physio and biochemical assay. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2011. Vol. 7. P. 813–822;
65. Khan S.A., Shahid S., Shahid B., Fatima U., Abbasi S.A. Green synthesis of MnO nanoparticles using *Abutilon indicum* leaf extract for biological, photocatalytic, and adsorption activities. *Biomolecules.* 2020. Vol. 10. 785;
66. Souri M., Hoseinpour V., Shakeri A., Ghaemi N. Optimisation of green synthesis of MnO nanoparticles via utilising response surface methodology. *IET Nanobiotechnol.* 2018. Vol. 12. P. 822–827;
67. Selim M.S., Fathallah N.A., Higazy S.A., Chen X., Hao Z. Novel blade-like structure of reduced graphene oxide/ α -Mn₂O₃ nanocomposite as an antimicrobial active agent against aerobic and anaerobic bacteria. *Mater. Chem. Phys.* 2023. Vol. 298;
68. Azhir E., Etefagh R., Mashreghi M., Pordeli P. Preparation, characterization and antibacterial activity of manganese oxide nanoparticles. *Phys. Chem. Res.* 2015. Vol. 3. P. 197–204;
69. Arularasu M., Devakumar J., Rajendran T. An innovative approach for green synthesis of iron oxide nanoparticles: characterization and its photocatalytic activity. *Polyhedron.* 2018. Vol. 156. P. 279–290;
70. Saravanan R., Khan M.M., Gupta V.K., Mosquera E., Gracia F., Narayanan V., Stephen A. ZnO/Ag/Mn₂O₃ nanocomposite for visible light-induced industrial textile effluent

degradation, uric acid and ascorbic acid sensing and antimicrobial activity. *RSC Adv.* 2015. Vol. 5. P. 34645–34651;

71. Abdtawfeeq T.H., Farhan Z.A., Al-Majdi K., Jawad M.A., Zabibah R.S., Riadi Y., Hadrawi S.K., Al-Alwany A., Shams M.A. Ultrasound-assisted and one-pot synthesis of new Fe₃O₄/Mo-MOF magnetic nanopolymer as a strong antimicrobial agent and efficient nanocatalyst in the multicomponent synthesis of novel pyrano[2,3-d]pyrimidines derivatives. *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* 2023. Vol. 33. P. 472–483;

72. Santoshi V., Banu A., Kurian G. Synthesis, characterization and biological evaluation of iron oxide nanoparticles prepared by *Desmodium gangeticum* root aqueous extract. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2015. Vol. 7. P. 75–80;

73. Subhashini G., Ruban P., Daniel T. Biosynthesis and characterization of magnetic (Fe₃O₄) iron oxide nanoparticles from a red seaweed *Gracilaria edulis* and its antimicrobial activity. *Int. J. Adv. Sci. Res. Manag.* 2018. Vol. 3. P. 184–189;

74. Avval Z.M., Malekpour L., Raeisi F., Babapoor A., Mousavi S.M., Hashemi S.A., Salari M. Introduction of magnetic and supermagnetic nanoparticles in new approach of targeting drug delivery and cancer therapy application. *Drug Metab. Rev.* 2020. Vol. 52. P. 157–184;

75. Arsalan N., Hassan Kashi E., Hasan A., EdalatDoost M., Rasti B., Ahamad Paray B., Zahed Nakhjiri M., Sari S., Sharifi M., Shahpasand K. Exploring the interaction of cobalt oxide nanoparticles with albumin, leukemia cancer cells and pathogenic bacteria by multispectroscopic, docking, cellular and antibacterial approaches. *Int. J. Nanomed.* 2020. Vol. 15. P. 4607–4623;

76. Sharma R.P., Raut S.D., Mulani R.M., Kadam A.S., Mane R.S. Sol–gel auto-combustion mediated cobalt ferrite nanoparticles: a potential material for antimicrobial applications. *Int. Nano Lett.* 2019. Vol. 9. P. 141–147;

77. Chandekar K.V., Shkir M., Alshahrani T., Ibrahim E.H., Kilany M., Ahmad Z., Manthrammel M.A., AlFaify S., Kateb B., Kaushik A. One-spot fabrication and in-vivo toxicity evaluation of core-shell magnetic nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C.* 2021. Vol. 122;

78. Sulaiman J.M., Hamdoon S.M., Abdulrahman G.Y. Antibacterial activity of cobalt ferrite (CoFe₂O₄) nanoparticles against oral enterococci. *Mater. Sci. Forum.* 2021. Vol. 1039. P. 150–159;

79. Tamboli Q.Y., Patange S.M., Mohanta Y.K., Sharma R., Zakde K.R. Green synthesis of cobalt ferrite nanoparticles: an emerging material for environmental and biomedical applications. *J. Nanomater.* 2023;

80. Razavi R., Molaei R., Moradi M., Tajik H., Ezati P., Shafipour Yordshahi A. Biosynthesis of metallic nanoparticles using mulberry fruit (*Morus alba* L.) extract for the preparation of antimicrobial nanocellulose film. *Appl. Nanosci.* 2020. Vol. 10. P. 465–476;

81. Maksoud M.A., El-Sayyad G.S., Ashour A., El-Batal A.I., Elsayed M.A., Gobara M., El-Khawaga A.M., Abdel-Khalek E., El-Okr M. Antibacterial, antibiofilm, and photocatalytic activities of metals-substituted spinel cobalt ferrite nanoparticles. *Microb. Pathog.* 2019. Vol. 127. P. 144–158;

82. Azam A., Ahmed A.S., Oves M., Khan M., Memic A. Size-dependent antimicrobial properties of CuO nanoparticles against Gram-positive and -negative bacterial strains. *Int. J. Nanomed.* 2012. Vol. 7. P. 3527–3535;

83. Wang L., Hu C., Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *Int. J. Nanomed.* 2017. Vol. 12. P. 1227–1249;

84. Dizaj S.M., Lotfipour F., Barzegar-Jalali M., Zarrintan M.H., Adibkia K. Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C*. 2014. Vol. 44. P. 278–284;
85. Hemalatha S., Makeswari M. Green synthesis, characterization and antibacterial studies of CuO nanoparticles from *Eichhornia crassipes*. *Rasayan J. Chem*. 2017. Vol. 10. P. 838–843;
86. Sayes C.M., Ameh T., Zarzosa K., Dickinson J., Braswell E.W. Nanoparticle surface stabilizing agents influence antibacterial action. *Front. Microbiol*. 2023. Vol. 14;
87. Asamoah R., Yaya A., Mensah B., Nbalayim P., Apalanga V., Bensah Y., Damoah L., Agyei-Tuffour B., Dodoo-Arhin D., Annan E. Synthesis and characterization of zinc and copper oxide nanoparticles and their antibacterial activity. *Results Mater*. 2020. Vol. 7;
88. Meraat R., Ziabari A.A., Issazadeh K., Shadan N., Jalali K.M. Synthesis and characterization of the antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles against *Salmonella typhi*. *Acta Metall. Sin. (Engl. Lett.)*. 2016. Vol. 29. P. 601–608;
89. Azizi-Lalabadi M., Ehsani A., Divband B., Alizadeh-Sani M. Antimicrobial activity of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles supported in 4A zeolite and evaluation of the morphological characteristic. *Sci. Rep*. 2019. Vol. 9;
90. Kavitha A., Doss A., Pole R.P., Rani T.K.P., Prasad R., Satheesh S. A mini review on plant-mediated zinc oxide nanoparticles and their antibacterial potency. *Biocatal. Agric. Biotechnol*. 2023. Vol. 49. 102654;
91. Basnet P., Chanu T.I., Samanta D., Chatterjee S. A review on bio-synthesized zinc oxide nanoparticles using plant extracts as reductants and stabilizing agents. *J. Photochem. Photobiol. B*. 2018. Vol. 183. P. 201–221;
92. Tiwari V., Mishra N., Gadani K., Solanki P., Shah N., Tiwari M. Mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticle against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Front. Microbiol*. 2018. Vol. 9;
93. Costa B.A., Abucafy M.P., Barbosa T.W.L., da Silva B.L., Fulindi R.B., Isquibola G., da Costa P.I., Chiavacci L.A. ZnO-ZIF-8 nanoparticles as nanocarrier of ciprofloxacin for antimicrobial activity. *Pharmaceutics*. 2023. Vol. 15;
94. Akbarzadeh F., Motaghi M., Chauhan N.P.S., Sargazi G. A novel synthesis of new antibacterial nanostructures based on Zn-MOF compound: design, characterization and a high performance application. *Heliyon*. 2020. Vol. 6;
95. Xing Y., Li X., Guo X., Li W., Chen J., Liu Q., Xu Q., Wang Q., Yang H., Shui Y., et al. Effects of different TiO₂ nanoparticles concentrations on the physical and antibacterial activities of chitosan-based coating film. *Nanomaterials*. 2020. Vol. 10;
96. Youssef A.M., El-Sayed S.M., Salama H.H., El-Sayed H.S., Dufresne A. Evaluation of bionanocomposites as packaging material on properties of soft white cheese during storage period. *Carbohydr. Polym*. 2015. Vol. 132. P. 274–285;
97. Hosseinzadeh S., Partovi R., Talebi F., Babaei A. Chitosan/TiO₂ nanoparticle/*Cymbopogon citratus* essential oil film as food packaging material: Physico-mechanical properties and its effects on microbial, chemical, and organoleptic quality of minced meat during refrigeration. *J. Food Process. Preserv*. 2020. Vol. 44;
98. Kaseem M., Hamad K., Ur Rehman Z. Review of recent advances in polylactic acid/TiO₂ composites. *Materials*. 2019. Vol. 12;
99. Ranjan S., Dasgupta N., Chakraborty A.R., Samuel S.M., Ramalingam C., Shanker R., Kumar A. Nanoscience and nanotechnologies in food industries: Opportunities and research trends. *J. Nanopart. Res*. 2014. Vol. 16;

100. Javed R., Zia M., Naz S., Aisida S.O., Ain N.U., Ao Q. Role of capping agents in the application of nanoparticles in biomedicine and environmental remediation: Recent trends and future prospects. *J. Nanobiotechnol.* 2020. Vol. 18;
101. Mustafa F., Andreescu S. Nanotechnology-based approaches for food sensing and packaging applications. *RSC Adv.* 2020. Vol. 10. P. 19309–19336;
102. Kuswandi B., Moradi M. Improvement of food packaging based on functional nanomaterial. In: Siddiquee S., Melvin G., Rahman M. (eds). *Nanotechnology: Applications in Energy, Drug and Food.* 2019. P. 309–344;
103. Araujo E.S., Pereira M.F.G., da Silva G.M.G., Tavares G.F., Oliveira C.Y.B., Faia P.M. A review on the use of metal oxide-based nanocomposites for the remediation of organics-contaminated water via photocatalysis: fundamentals, bibliometric study and recent advances. *Toxics.* 2023. Vol. 11(8). 658;
104. Yang Z., Shen J. A review: metal and metal oxide nanoparticles for environmental applications. *Nanoscale.* 2025. Vol. 17. P. 15068–15085;
105. Kavya M.P.M., Keshava Kumar P.S. A review on metal oxide nano-materials for water treatment. *Int. J. Environ. Sci.* 2025. Vol. 11(8s). P. 953–969;
106. Khalifa M., et al. Nanoparticles as antibacterial agents for textile finishing. *J. Textile & Clothing Sci.* 2024. Vol. 22(1). P. 157–162;
107. Maffei G., et al. Silver nanoparticle-based finishing for leather antimicrobial and UV protection. *Micromachines.* 2024. Vol. 16(4);
108. Insights into functional polymer-based organic–inorganic nanocomposites as leather finishes. *Collagen and Leather. SpringerOpen,* 2019;
109. Wu J., Zhao L., Liu X., Chen W., Haibin G. Recent progress in cleaner preservation of hides and skins. *J. Clean. Prod.* 2017;
110. Razzaq M.A., Chowdhury M.J., Uddin M.T. Salt-free preservation of raw goat skin using *Swietenia mahogany* seed extract. *J. Am. Leather Chem. Assoc.* 2022. Vol. 117(2);
111. Hashem M.A., Momen M.A., Hasan M. Leaf paste aided goat skin preservation: significant chloride reduction in tannery. *J. Environ. Chem. Eng.* 2018. Vol. 6(4);
112. Kanagaraj J., Sastry T.P., Rose C. Effective preservation of raw goat skins for the reduction of total dissolved solids. *J. Clean. Prod.* 2005. Vol. 13(9);
113. Muthukrishnan L., Ramakrishnan P. Pretreatment evaluation of gallic acid tuned nanosilver for short-term preservation of goat skins in leather processing. *J. Nanopart. Res.* 2021. Vol. 23(7);
114. Lakshmipathy M., Nanda A. Assessment of in vitro prophylactic efficacy of gallic acid fabricated silver nanoparticles. *J. Chem. Pharm. Res.* 2015. Vol. 1(7);
115. El-Zowalaty M.E., Al-Ali S.H.H., Hussein M.I., Geilich B.M., Webster T.J., Hussein M.Z. The ability of streptomycin-loaded chitosan-coated magnetic nanocomposites to possess antimicrobial and antituberculosis activities. *Int. J. Nanomed.* 2015. Vol. 10;
116. Rao J.R., Kumar M.P., Kannan K.C., Nair B.U. A polymer-based preservation: a new horizon in leather making. In: *32nd Congress of the International Union of Leather Technologists and Chemist Societies (IULTCS 2013).* 2013;
117. Saravanabhavan S., Aravindhan R., Thanikaivelan P., Rao J.R., Nair B.U. Green solution for tannery pollution: effect of enzyme-based lime-free unhairing and fibre opening in combination with pickle-free chrome tanning. *Green Chem.* 2003. Vol. 5(6);
118. Husain Q., Ansari S.A., Alam F., Azam A. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase on zinc oxide nanoparticles via simple adsorption mechanism. *Int. J. Biol. Macromol.* 2011. Vol. 49(1);

119. Uddin M.M., Hasan M.J., Mahmud Y., Uddin N., Rahman K.T., Nishad I.J.A., Shamsuddin S.M. A cleaner goatskin preservation with leaf paste and powder; an approach for salinity remediation in tannery wastewater. *Cleaner Eng. Technol.* 2022. Vol. 6;
120. Murugappan G., Khambhaty Y., Sreeram K.J. Protease immobilized nanoparticles: a cleaner and sustainable approach to dehairing of skin. *Appl. Nanosci.* 2020. Vol. 10(1);
121. Gu H., Zhao L., Ma J., Yang Y., Zhao C., Chen W. Control of microorganisms on tanned leather: from fungicide to antimicrobial function leather. *J. Am. Leather Chem. Assoc.* 2016. Vol. 111. P. 69–87;
122. Dastjerdi R., Montazer M. A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: focus on anti-microbial properties. *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 2010;
123. Jia G., Song Y., Yang M.M., Liu K.-j.K., Zheng Y., You H., Tanaka M.M., et al. Supporting information. *J. Mater. Chem.* 2009. Vol. 22(1);
124. Kothandam R., Muthuraman P., Jayavel R., Gupta S. A novel nano-finish formulation for enhancing performance properties in leather finishing applications. *J. Clust. Sci.* 2016. Vol. 27(4);
125. Kolomaznik K., Adamek M., Andel I., Uhlirova M. Leather waste - potential threat to human health, and a new technology of its treatment. *J. Hazard. Mater.* 2008. Vol. 160(2–3);
126. Bacardit A., Casas C., Bou J., Olle L. Development of micro/nanocomposites with antibacterial effect for leather and textile. *J. Am. Leather Chem. Assoc.* 2016. Vol. 111(7);
127. Kaygusuz M.K., Meyer M., Junghans F., Aslan A. Modification of leather surface with atmospheric pressure plasma and nanofinishing. *Polym. Plast. Technol. Eng.* 2018. Vol. 57(4).

1.28 ВІРУСОЛОГІЯ В БІОТЕХНОЛОГІЇ: ФУНДАМЕНТ, ІНСТРУМЕНТИ ТА ІННОВАЦІЇ

Жолобак Н. М.

Інститут мікробіології і вірусології ім.Д.К.Заболотного НАН України
Київський національний університет технологій та дизайну
n.zholobak2018@gmail.com

В роботі проаналізовано історію та сучасний стан біотехнологічного застосування вірусів у медицині, сільському господарстві та біофармації. Об'єктом дослідження є віруси та вірусоподібні частки, включно з бактеріофагами, адено-асоційованими, аденовірусними та лентівірусними векторами. Розглянуто їхні функції як терапевтичних агентів, платформ для вакцин, інструментів генної терапії та систем експресії, а також сучасні біоінформатичні підходи й питання біобезпеки.

Ключові слова: вірусологія, біотехнологія, вірусні вектори, наномедицина, біоінформатика, біобезпека

Скачок в розумінні того, що *contagium vivum fluidum* є самостійним інфекційним агентом і викликає мозаїчну хворобу у тютюну у 1892 році Д. Й. Івановським та введення терміну вірус у 1898 році М. В. Беєрінком [1] дав поштовх для розширення наших знань про субмікрометрові форми життя, створив новий напрямок в мікробіології – інфрамікробіологію, яка згодом стала самостійною наукою – вірусологією. Саме роботи мікробіологів першої половини ХХ століття, які вивчали явище лізису бактерій (М. Ф. Гамалея, Ф. Туорт, Ф. Д'Ерель), описали його, виділили та вперше застосували бактеріофаги для лікування хворих, заклали інструментарій для наступного становлення і розвитку молекулярної біології та її практичної реалізації в біотехнології [2].

Необхідно визнати, що зараз – більш ніж через 100 років з моменту виявлення того, що в навколишньому середовищі існують нанометрові об'єкти живої природи – основний науковий масив знань ґрунтується саме на розумінні механізмів взаємодії бактеріофаг-бактерія [3]. І це закономірно, оскільки експериментальні методи для роботи з такими об'єктами та способи аналізу дозволяють отримати фундаментальний набір даних за досить короткий період часу. Звичайно, розвиток та удосконалення методів культивування клітин *in vitro* дозволив працювати і з еукаріотичними клітинами та вивчати особливості їх взаємодії з патогенними вірусами. Але досягти такого рівня глибини розуміння процесів, – як це вже досягнуто для взаємодії фаг-бактерія – це завдання науки ХХІ століття.

Повертаючись до фагів слід зазначити їх високий потенціал застосування як ефективних препаратів проти мультирезистентних бактерій для вирішення проблеми антибіотикорезистентності в медицині

завдяки високій специфічності дії: їх застосування (в тому числі, проти біоплівки) не впливає на стан мікробіому організму. Окрім того, літичні фаги можна застосовувати комбіновано з антибіотиками. Вказаний підхід є перспективним і для сільськогосподарських тварин, і в рибному господарстві, яке зараз зазнає активного розвитку [4].

Звичайно, потрібно враховувати і зауваження щодо системного введення фагів: їх присутність в організмі може супроводжуватись формуванням антитіл, а при повторному введенні – ініціюватись реакція нейтралізації. Окрім того, як і для всіх біотехнологічних препаратів, актуальними є питання щодо виконання регуляторних вимог при їх виробництві, зокрема масштабуванні та доставці. На жаль, для виробників фагових препаратів не розроблені загальноприйняті стандарти тестів на чутливість, методи підготовки вірусних коктейлів і контролю їх якості (титри вірусів, чистота, генотоксичність), що ускладнює відтворюваність і порівняння результатів. Виробництво специфічних фагів (індивідуальні коктейлі) економічно і регуляторно складне; потребує валідації процесів, контролю залишкових бактеріальних компонентів і стандартизації дозування. І ще один важливий момент – це еволюція резистентності, оскільки бактерії можуть розвивати стійкість до фагів [5].

Цікавим напрямком біотехнологічного застосування фагів є їх використання як екологічно безпечної альтернативи хімічним пестицидам [6]: вони можуть бути дієвим інструментом стійкого контролю бактеріальних захворювань (стан водних ресурсів, агрономічні практики для зменшення втрат врожаю та враження культур фітопатогенами *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia* тощо) в умовах зміни клімату і зростаючої потреби в екологічних рішеннях [7]. Біотехнологічне виробництво фагових препаратів здійснюється у широкому спектрі промислово розвинутих країн: у США, Канаді, Англії, Німеччині, Ізраїлі, на теренах бувшого Радянського Союзу, де перший інститут, що займався вивченням бактеріофагів та створенням на їх основі препаратів, був заснований у Грузії ще за активної участі Ф. Д'Ереля; є таке виробництво і в Україні.

Застосування вірусів як біотехнологічних інструментів знайшло своє місце у генній та клітинній терапії. За понад 35 років історії галузь генної терапії зазнала значного прогресу. Початкова концепція – заміна дисфункціональних генів на правильні – перейшла на наступний етап і досягла рівня точного редагування геному. Десятки продуктів генної терапії на основі вірусних і невірусних платформ доставки були затверджені, що ознаменувало початок ери генної терапії [8]. Ці стратегії використання вірусів як векторів, здатних нести корисні фрагменти генетичного матеріалу, базуються на аденовірусах, аденоасоційованих вірусах, інструментах, отриманих з лентивірусів тощо.

Прикладом, що став вже класичним, є адено-асоційований вірус (AAV): ключовий інструмент доставки в клінічній генній терапії, який має мінімальну патогенність та забезпечувати довготривалу експресію генів у

клітинах різних тканин. Розроблений рекомбінантний AAV (rAAV), який має вищу специфічність. У фундаментальному огляді Wang проаналізовано біологію AAV з акцентом на сучасні стратегії векторної інженерії та виробничі технології. rAAV застосовують у поточних клінічних випробуваннях для лікування очних, неврологічних, метаболічних, гематологічних, нейром'язових та серцево-судинних захворювань, а також пухлинних процесів [9]. Сім продуктів генної терапії на основі rAAV отримали регуляторне схвалення, хоча ще висловлюються занепокоєння щодо безпечного використання високодозових вірусних терапій у людей, оскільки не виключені ускладнення імунної відповіді та прояви генотоксичності, гепатотоксичності, тромботичної мікроангіопатії та нейротоксичності. На відміну від AAV-векторів, які мають обмежений розмір генетичної вставки (~4.7 kb), аденовіруси дозволяють транспортувати генетичні вставки суттєво більших розмірів. Саме їх використали ряд виробників вакцин проти SARS-CoV-2 [10].

Окремим напрямком в розробці методів протипухлинної терапії є застосування онколітичних вірусів, які не тільки викликають загибель пухлинних клітин (вірус-опосередкований онколіз), а й модулюють протипухлинну імунну відповідь, активуючи як вроджені, так і адаптивні імунні механізми. Тобто реалізують імунотерапевтичні стратегії, які є критично важливими при онкогенезі. В роботі Lin [11] детально проаналізовано як клінічну ефективність таких підходів, так і безпеку їх застосування, оскільки потужні імуномодулюючі ефекти можуть мати побічні наслідки та вимагають тонкого балансування між імунною активацією та контролем потенційної токсичності.

Ще одним напрямком, який активно розвивається на даний час, є застосування лентивірусних векторів (LV). Вони – стандарт для *ex-vivo* модифікацій гемопоетичних або Т-клітин з метою підвищення їх здатності спеціально націлюватися на ракові клітини (CAR-T). LV забезпечують інтеграцію та довготривалу експресію необхідного генетичного матеріалу. Застосування LV охоплюють різні захворювання людини: неврологічні, очні, гематологічні, метаболічні, ракові, імунологічні, шкірні, вірусні інфекції та захворювання легень [8]. Останні дослідження також розвивають підходи для застосування LV *in-vivo*, але питання безпеки є досить актуальними: вона має певні побічні ефекти, такі як синдром вивільнення цитокінів, нейротоксичність, тривала цитопенія у короткостроковій перспективі, а також теоретичний ризик вторинного злоякісного утворення в довгостроковій [12].

Загалом, станом на кінець 2024 року було затверджено 55 продуктів генної терапії не враховуючи векторні вакцини та негенетично модифіковану клітинну терапію. Звичайно, актуальною є регуляція виробництва таких продуктів, оскільки перехід від досліджень до комерційних продуктів ускладнений вимогами GMP, необхідністю масштабувати виробництво без копіювальних дефектів, дотримання стандартизації продукту. Тобто питання

якості та реплікаційних артефактів залишаються критичними для усіх продуктів генної терапії [8].

Окрема біотехнологічна платформа для створення вакцин і наноматеріалів – вірусоподібні частки (VLP) – це здатні до самозбирання білкові частинки, що імітують морфологію вірусів. Але у їх складі відсутній генетичний матеріал, тобто такий об'єкт здатен активувати імунну відповідь, але не здатен розмножуватись [13]. Завдяки повторюваній мультивалентній презентації епітопів і безгеномній природі VLP поєднують високий імуногенний потенціал і добрий профіль безпеки, що робить їх привабливими як вакцинні платформи та як біосумісні наноматеріали для доставки й інкапсуляції. Станом на 2020–2024 рр. VLP-підходи активно розвивалися в контексті COVID-19 і ширших нанобіотехнологічних застосувань [14]. Розрізняють необолонкові (*non-enveloped*) VLP, які формуються з одного або кількох капсидних білків (наприклад, вірус головки бактеріофага) та оболонкові (*enveloped*) VLP, які збираються навколо мембранної оболонки, часто потребують допоміжних білків для стабільності. Різні архітектури визначаються розміром, симетрією (Т-число) та можливістю презентації чужорідних пептидів. У VLP для конструювання та презентації антигенів використовують метод вбудовування вірусного пептиду в капсидний білок, так зване генетичне ф'южн-включення, хімічну кон'югацію поверхневих пептидів, а для мультивалентної презентації антигенів створюють мозаїчні/химерні VLP. Важливі параметри таких біотехнологічних конструкцій – щільність розміщення епітопів на поверхні, їх просторова орієнтація, стабільність збірки. Все це зумовлює прямий вплив на відповідь В- та Т-лімфоцитів. Тобто, VLP – це універсальна та перспективна платформа для розробки вакцин. Їхня здатність імітувати віруси, усуваючи ризики, пов'язані з живими вакцинами, робить їх досить привабливими. Наразі затверджені VLP вакцини демонструють, що вони можуть забезпечити ефективний захист від широкого спектру захворювань: проти вірусу папіломи людини (*Cervarix, Gardasil, Gardasil 9*), вірусу гепатиту В, вірусу гепатиту Е (*Hecolin*), а кілька VLP-кандидатів для SARS-CoV-2 пройшли доклінічні й клінічні випробування. Досягнення у виробництві VLP дозволять отримати високоєфективні вакцини, суттєво полегшуючи задачі імунізації [15].

Біотехнологічна задача створення та виробництва вакцин потребує подальшого вивчення з метою спрощення та прискорення їх виробництва, отримання максимально наближеного до потреб продукту. Саме тому цікавим напрямком є розробка вірусних вакцин нового покоління для якої використовують молекулярні та біотехнологічні підходи, що дозволяють швидко створювати та адаптувати вакцини, модулювати імунну відповідь, забезпечувати високу імуногенність і масштабованість – якого не було у традиційних інактивованих чи атенуйованих вакцинах. Пандемія COVID-19 продемонструвала, що платформи, які поєднують швидку адаптацію і масштабованість, можуть радикально скоротити час до застосування вакцин. Однак кожна з цих технологій має свої вузькі місця: потреби в

холодовому ланцюгу, виробничі обмеження, імунологічні профілі, ризики рідкісних побічних явищ і здатність до мультивалентності або універсального покриття. Нове покоління вакцин має поєднати швидкість адаптації, економічність виробництва, термостабільність і адекватну імунну відповідь.

Серед вакцин нового покоління – mRNA-платформи, які в умовах COVID-19 показали, що потребують мінімального часу для розробки, характеризуються легкою масштабованістю і можливістю швидкого редизайну під нові штами. Їх застосування викликає високі титри нейтралізуючих антитіл у людей (підтвержені у фазі III клінічних досліджень). Але є ряд обмежень, оскільки їх транспорт потребує використання ліпідних наночасток, дотримання холодового ланцюга, відносно великі дози; іноді на їх введення виражена локальна/системна реактивність. Водночас залишається низка питань: тривалість і широта імунітету (особливо для респіраторних вірусів), оптимізація дозування/ад'ювантів, логістика доставлення (LNP) та регуляторні/фінансові аспекти [16].

Самоампліфікуючі РНК (self-amplifying RNA, saRNA) мають суттєву перевагу, оскільки внутрішньоклітинне нарощування реплікона забезпечує значну економію доз (1–10 µg проти десятків мікрограм для звичайної mRNA-вакцини), що знижує її собівартість і підвищує масштабованість. Клінічні інтегровані дослідження ARCT-154 продемонстрували добру імуногенність при дуже малих дозах та порівнянну або конкурентну реакцію проти стандартних векторів у випробуваннях 2024 року [17]. Обмеженнями до впровадження saRNA є суттєво більший розмір молекули, який ускладнює її утворення та очистку; введення saRNA, залежно від її дизайну, може супроводжуватись підвищеною інтерферон-залежною реакцією. Okремо необхідно вирішувати регуляторні питання щодо походження реплікона у складі вакцини. saRNA виглядає як логічний «ступінь» еволюції mRNA-платформ для проєктів, де важлива економічність дози і швидке масштабування.

Іншим напрямком є розробка вірусних векторних вакцин, які розглядаються як безпечні і здатні викликати як вроджені, так і адаптивні імунні відповіді без участі повністю небезпечного патогена. Крім того, вірусні вектори мають внутрішні ад'ювантні властивості завдяки експресії різноманітних патогено-асоційованих молекулярних патернів (PAMP) та активації вродженого імунітету. Їх можна конструювати для доставки антигенів у певні клітини або тканини. Аналогічно, їх можна зробити здатними до реплікації або дефіцитними для підвищення їх безпеки та зниження реактогенності. Зокрема, вакцина з вірусним вектором може повторювати природний процес інфекції певних патогенів, запускаючи класичне гостре запалення та імунну відповідь через природне вироблення PAMPs, що дозволяє індукувати локально-слизовий і системний імунітет. Ряд вакцин на основі вірусних векторів вже пройшли фазу III клінічних випробувань або були затверджені. В роботі [18] проведено огляд таких

вакцин на основі вірусу везикулярного стоматиту (VSV), вірусу сказу (RABV), вірусу парагрипу (PIV), вірусу кору (MeV), вірусу хвороби Ньюкасла (NDV), вірусу грипу (IFV), аденовірусу (AdV) та векторів вірусу віспи з точки зору їх застосування до загрозливих для життя інфекційних захворювань, а також імунотерапії раку. Перевагами їх є сильна активація Т-клітин (особливо CD8+), можливість однодозової схеми, добра стабільність для логістики, а недоліками – формування імунної відповіді до вірусного вектора. Нові підходи фокусуються на «ретушуванні» капсиду, рідкісних серотипах або специфічній модифікації для уникнення імунної реакції, сформованої попереднім введенням вектора [19].

Рекомбінантні білкові вакцини широко використовуються в профілактиці інфекційних захворювань, оскільки є термостабільними, мають високий профіль безпеки та добре відпрацьовані регуляторні шляхи, що дозволяє розпочинати клінічні випробування швидко і стабільно. Вакцини на основі наночасток з мозаїчно розташованими білковими рецептор-зв'язувальними структурами, можуть сприяти більш сильній імуногенній відповіді, мультивалентній презентації антигенів і стабільності, що робить їх перспективними для широкого спектру вірусів. Недоліками таких вакцин є більш тривалий дизайн білкових антигенів, необхідність оптимізації ад'ювантів та складність масштабування виробництва під GMP-умови, що збільшує час та вартість розробки [20].

Один із найбільш активних напрямків – біотехнологічне застосування вірусів, зокрема вірусних систем експресії для фармацевтичного отримання медичних препаратів. Лідером у виробництві складних рекомбінантних білків і вірусоподібних часток з поступовим переходом до невірусних варіантів є векторна система на основі бакуловірусів [21]. Унікальну якість (хоча мають високу вартість виробництва) продуктів для медицини забезпечують клітинні системи ссавців [22]. Найпоширенішими серед них є культури клітин яєчника китайського хом'яка (CHO) та людської ембріональної нирки 293 (HEK293). Система експресії клітин ссавців включає систему стабільної та тимчасової експресії генів, при цьому остання має переваги – це короткі цикли і простота функціонування. Саме оптимізація системи тимчасової експресії генів значно покращила експресію рекомбінантних білків [23]. Економічно вигідною альтернативою для продукування вакцин і біологічно активних сполук є застосування генетично модифікованих рослинних систем [24]. Їх перевагами є низька собівартість, швидке масштабування через агроінфільтрацію, безпечність (відсутність патогенності для людини). Особливо ефективною є транзитна експресія в *Nicotiana benthamiana*, що дозволяє отримати рекомбінантні білки впродовж кількох днів після агробактеріальної інфільтрації, зазвичай у межах 3–10 днів, що робить цю платформу надзвичайно ефективною для швидкого виробництва білків у рослинних біореакторах [25]. Недоліками таких систем є наявність рослинних гліканів, які можуть бути імуногенними, а також регуляторна невизначеність щодо виробництва генетично модифікованих продуктів у

різних країнах. Незважаючи на це, рослинні системи продовжують розвиватися як масові виробничі платформи для вакцин, антитіл і ферментів.

Загалом необхідно зауважити, що спостерігається тенденція до переходу від природних до штучно сконструйованих платформ, де можна керувати усіма етапами: від транскрипції до глікозилування. В публікації Chen зі співавторами продемонстровано створення синтетичної платформи для програмного контролю транскрипції, де з використанням модульних елементів (*synthetic promoters, crisprTFs*) досягається тонке регулювання експресії генів у клітинах ссавців, що є яскравим прикладом переходу від природних до штучно сконструйованих систем з можливістю керувати транскрипцією [26]. Майбутнє за вірусними системами експресії, які мають працювати як повністю контрольовані біотехнологічні фабрики, здатні виробляти широкий спектр біологічно активних білків для медицини та ветеринарії.

Зворотною стороною біотехнологічного застосування вірусів є їх використання в розробці антивірусних стратегій, які включають застосування моноклональних антитіл, високоспецифічного пригнічення важливих вірусних транскриптів (siRNA/ASO) [27] застосування системи CRISPR-Cas13 з метою активації деградації РНК-вірусів, а також інгібіторів клітинних факторів або білкових «ловців», які зменшують ризик формування резистентності.

І, розглядаючи наш власний геном з точки зору синтетичної та системної вірусології, важливим є виділення ендогенних вірусних елементів (endogenous viral elements – EVEs) – інтегрованих в геном залишків вірусів. Їх функція тісно пов'язана із гомеостазом організму та його реакцією на фактори зовнішнього середовища. Саме в EVEs закодовані послідовності пептидів, що презентуються на МНС та потенційно сприяють толерантності або аутоімунним реакціям [28]. EVEs – постачальники регуляторних елементів, що модулюють транскрипцію генів імунної відповіді, можуть кодувати пептиди, які презентуються на МНС І класу як епітопи та здатні викликати поліфункціональну Т-клітинну відповідь та тривалий імунітет у контексті антиракових вакцин [29]. EVEs – основа для синтезу некодуючих РНК, які беруть участь в імунному контролі мобільних елементів, можуть працювати як регуляторні елементи (промотори/енхансери), що модулюють транскрипцію імунної відповіді генів, впливаючи на експресію відповідних генетичних програм в імунокомпетентних клітинах [30] Взаємодія між ендогенними (EVEs) та екзогенними вірусами реалізується в клітині як конкурентна інтерференція або стимуляція антивірусних шляхів.

До EVEs відносять і ендогенні ретровіруси людини (HERVs) – транспозони ДНК, які інтегровані в геном людини та становлять приблизно 8% геному людини. HERV причетні до патогенезу нейродегенеративних захворювань – групи захворювань ЦНС, що характеризуються поступовою втратою структури та функції нейронів, що призводить до загибелі клітин і

множинних фізіологічних дисфункцій. Багато доказів свідчать, що HERV є ініціаторами або рушіями нейродегенеративних процесів при розсіяному склерозі та аміотрофічному латеральному склерозі, а також в інших серйозних нейродегенеративних захворюваннях: деменції, хворобі Альцгеймера та Паркінсона [31]. Тобто HERV-последовності асоційовані з запаленням та нейродегенеративними станами.

З точки зору біотехнологічного та клінічного застосування EVEs – це привабливі інструменти, які можуть слугувати сильними тканинно-специфічними регуляторними елементами. Наприклад, це промотори вірусного походження та довгі кінцеві повтори (*long terminal repeats, LTR*). Синцитин-подібні білки, такі як Syncytin-1 і Syncytin-2, походять від ендогенних ретровірусів і функціонують як білки-фузогени, здатні сприяти злиттю клітин через механізм, подібний до вірусного мембранного злиття (виконують ключову роль у формуванні плаценти у ссавців – злиття трофобластних клітин). Ці білки взаємодіють зі специфічними рецепторами на плазматичній мембрані, викликаючи злиття сусідніх клітин і формування синцитіальних структур, що робить їх перспективними модуляторами процесів клітинного злиття у біотехнології та медицині [32]. EVEs можуть служити джерелом імуногенних антигенів, представлених як МНС-епітопи на пухлинних клітинах, здатних викликати CD4⁺ і CD8⁺ Т-клітинні відповіді та забезпечувати захист від пухлин у доклінічних моделях. Це відкриває перспективи використання EVEs для розробки персоналізованих антиракових вакцин і імунних терапій, для терапії автоімунних станів шляхом таргетної модуляції [33].

Одним із інноваційних підходів у біотехнології для моделювання взаємодії вірус-клітина є застосування методів біоінформатики. Біоінформатика як дисципліна забезпечує формальні та обчислювальні методи для обробки, аналізу та інтерпретації біологічних даних, зокрема даних геноміки, протеоміки та метагеноміки. В контексті вірус-клітинної взаємодії вона поєднує алгоритмічні підходи, моделі машинного навчання, обробку великих даних та мережеву біологію для побудови моделей, які пояснюють механізми інфікування, адаптації та патогенезу вірусів. Класичною метою є інтеграція даних високої пропускну здатності (секвенування геномів, транскриптомні профілі) для побудови модулів взаємодій вірусного та клітинного білків. Тобто, біоінформатика дозволяє прогнозувати результати взаємодії між білками вірусу та клітини, що може визначити потенційні мішені для біотехнологічної розробки антивірусних препаратів [34]. З цією метою використовують методи, які поєднують аналіз онтологій генів і техніки обробки природної мови (як і в природних мовах, білкові последовності оцифровують, щоб надати їх як вхідні дані алгоритму навчання), що дозволяє перетворювати функціональні анотації білків у числові вектори для подальшого навчання моделей і призводить до значного скорочення кількості аналізованих ознак без втрати якості прогнозування [35]. Методи прогнозування спектру клітин-господарів дозволяє визначити універсальну ключову точку вірус-клітинної взаємодії, оцінити можливі

альтернативні варіанти та ймовірності переходу вірусу до іншого господаря, що важливо для екологічної вірусології та оцінки ризику появи нових патогенів і, відповідно, створення біотехнологічних препаратів до моменту їх появи [36]. Ефективним напрямком є розробка еволюційних моделей, що включатимуть динаміку коеволюції вірусів та клітин і відкриватимуть перспективу прогнозування еволюції процесу вірус-клітинної взаємодії [37]. Математичні та обчислювальні моделі дозволяють рухатися від «коротких» експериментальних результатів до глобального розуміння системних аспектів інфекційного процесу і, відповідно, способів впливу на них, вказувати напрямок практичного застосування біотехнологічних розробок.

З іншого боку, в роботі [38] проведений систематичний огляд і ретельний аналіз стандартних точок оцінки 27 сучасних інструментів прогнозування вірус-клітинної взаємодії, результатом якого є визнання існування ряду обмежень методів біоінформатики: сильної залежності продуктивності від контексту, необхідності враховувати критичний компроміс між точністю прогнозування, швидкістю прогнозування та обчислювальними витратами. Прогрес та інтенсивний розвиток у вказаному напрямку зумовлений поєднанням різних статистичних підходів, інтеграцією багатомодальних даних та розробкою стандартних тестових наборів даних для об'єктивної оцінки продуктивності алгоритмів. Суттєвим зауваженням на користь біоінформатики є те, що моделі, які аналізують метагеномні дані, дозволяють виявляти вірусні послідовності без потреби в культивуванні вірусів, що критично при дослідженні різноманітних екологічних систем чи складних мікробіомів. А їх поєднання з моделями прогнозування взаємодій і діапазону клітин-господарів створює більш цілісну картину.

На відміну від вірусології, де вірусні вектори застосовуються як інструменти фундаментального аналізу молекулярних процесів, у біотехнології вірусні вектори – це ключові платформи для генної терапії, вакцинології, онколітичних підходів та синтетичної біології [39]. Саме тому стандарти біобезпеки у цій сфері виходять далеко за межі формального дотримання лабораторних процедур і набувають характеру системної концепції управління біологічними ризиками, спрямованої на мінімізацію ймовірності ненавмисного вивільнення рекомбінантних або модифікованих вірусів, захист персоналу та довкілля, а також на попередження потенційного зловживання результатами досліджень. Нормативне забезпечення біотехнологічних досліджень з використанням вірусів як інструментів забезпечується системою правових актів, які регламентують не лише безпеку роботи з біологічними агентами, а й умови проектування, проведення і оцінки результатів таких досліджень.

В Україні сформована відповідна законодавча база, що забезпечує дотримання вимог, спрямованих на створення сучасної комплексної системи біологічної безпеки та біозахисту, відповідає сучасним міжнародним стандартам та включає питання поводження з усіма видами біологічних матеріалів, у тому числі тих, що можуть становити небезпеку для здоров'я людей [40].

Узагальнюючи слід зауважити, що віруси – не стільки патогени, скільки потужні інструменти біотехнології, генної інженерії, нанотехнологій, діагностики, терапії та біоконтролю.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Oldstone MBA. History of Virology. *Encyclopedia of Microbiology*. 2014:608–12. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.00078-7>
2. Stone E, Campbell K, Grant I, McAuliffe O. Understanding and Exploiting Phage-Host Interactions. *Viruses*. 2019 Jun 18;11(6):567. <https://doi.org/10.3390/v11060567>
3. Vandamme, E.J. and Mortelmans, K. (2019), A century of bacteriophage research and applications: impacts on biotechnology, health, ecology and the economy!. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 94: 323-342. <https://doi.org/10.1002/jctb.5810>
4. Siyanbola KF, Ejiohuo O, Ade-adekunle OA, *et al.* Bacteriophages: sustainable and effective solution for climate-resilient agriculture, *Sustainable Microbiology*, Volume 1, Issue 1, January 2024, qvae025, <https://doi.org/10.1093/sumbio/qvae025>
5. Cui, L., Watanabe, S., Miyanaga, K., & Wannigama, D. L. (2024). A Comprehensive Review on Phage Therapy and Phage-Based Drug Development. *Antibiotics*, 13(9), 870. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13090870>
6. Ul Haq I, Khan M, Khan I. Phytopathological management through bacteriophages: enhancing food security amidst climate change. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2024 Jan 9;51:kuae031. <https://doi.org/10.1093/jimb/kuae031>
7. Nakayinga, R., Makumi, A., Tumuhaise, V. *et al.* *Xanthomonas* bacteriophages: a review of their biology and biocontrol applications in agriculture. *BMC Microbiol* 21, 291 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02351-7>
8. Jargalsaikhan, B.-E., Muto, M., & Ema, M. (2025). The Era of Gene Therapy: The Advancement of Lentiviral Vectors and Their Pseudotyping. *Viruses*, 17(8), 1036. <https://doi.org/10.3390/v17081036>.
9. Wang, JH., Gessler, D.J., Zhan, W. *et al.* Adeno-associated virus as a delivery vector for gene therapy of human diseases. *Sig Transduct Target Ther* 9, 78 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01780-w>
10. Sallard, E., Zhang, W., Aydin, M., Schröer, K., & Ehrhardt, A. (2023). The Adenovirus Vector Platform: Novel Insights into Rational Vector Design and Lessons Learned from the COVID-19 Vaccine. *Viruses*, 15(1), 204. <https://doi.org/10.3390/v15010204>
11. Lin, D., Shen, Y. & Liang, T. Oncolytic virotherapy: basic principles, recent advances and future directions. *Sig Transduct Target Ther* 8, 156 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01407-6>
12. Ottaviano, G.; Qasim, W. Current Landscape of Vector Safety and Genotoxicity after Hematopoietic Stem or Immune Cell Gene Therapy. *Leukemia* 2025, 39, 1325–1333. [Google Scholar].
13. Kanekiyo M, Buck CB. Virus-Like Particle and Nanoparticle Vaccines. *Human Vaccines*. 2017:87–98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802302-0.00003-0>
14. Mohsen, M.O., Bachmann, M.F. Virus-like particle vaccinology, from bench to bedside. *Cell Mol Immunol* 19, 993–1011 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41423-022-00897-8>
15. Bachmann MF, van Damme P, Lienert F, Schwarz TF. Virus-like particles: a versatile and effective vaccine platform. *Expert Rev Vaccines*. 2025 Dec;24(1):444-456. <https://doi.org/10.1080/14760584.2025.2508517>
16. Gote, V., Bolla, P. K., Kommineni, N., Butreddy, A., Nukala, P. K., Palakurthi, S. S., & Khan, W. (2023). A Comprehensive Review of mRNA Vaccines. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2700. <https://doi.org/10.3390/ijms24032700>
17. Hò NT, Hughes SG, Ta VT, ...& Nguyen XH. Safety, immunogenicity and efficacy of the self-amplifying mRNA ARCT-154 COVID-19 vaccine: pooled phase 1, 2, 3a and 3b

- randomized, controlled trials. *Nat Commun.* 2024 May 14;15(1):4081. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-47905-1>
18. Wang, S., Liang, B., Wang, W. *et al.* Viral vectored vaccines: design, development, preventive and therapeutic applications in human diseases. *Sig Transduct Target Ther* 8, 149 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01408-5>
 19. Sampson AT, Hlaváč M, Gillman ACT, Douradinha B, Gilbert SC. Developing the next-generation of adenoviral vector vaccines. *Hum Vaccin Immunother.* 2025 Dec;21(1):2514356. <https://doi.org/10.1080/21645515.2025.2514356>
 20. Qian, G., Gao, C., Zhang, M., Chen, Y., & Xie, L. (2024). A Review of Protein-Based COVID-19 Vaccines: From Monovalent to Multivalent Formulations. *Vaccines*, 12(6), 579. <https://doi.org/10.3390/vaccines12060579>
 21. Kost, T., Condreay, J. & Jarvis, D. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol* 23, 567–575 (2005). <https://doi.org/10.1038/nbt1095>
 22. Walsh, G., Walsh, E. Biopharmaceutical benchmarks 2022. *Nat Biotechnol* 40, 1722–1760 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01582-x>
 23. Fu, Y., Han, Z., Cheng, W. *et al.* Improvement strategies for transient gene expression in mammalian cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 108, 480 (2024). <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13315-y>
 24. Chen Q, Lai H. Plant-derived virus-like particles as vaccines. *Hum Vaccin Immunother.* 2013 Jan;9(1):26-49. <https://doi.org/10.4161/hv.22218>
 25. Nosaki S, Miura K. Transient expression of recombinant proteins in plants. *Methods Enzymol.* 2021;660:193-203. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2021.04.021>
 26. Chen, W.C.W., Gaidukov, L., Lai, Y. *et al.* A synthetic transcription platform for programmable gene expression in mammalian cells. *Nat Commun* 13, 6167 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33287-9>
 27. Ning L, Liu M, Gou Y, Yang Y, He B, Huang J. Development and application of ribonucleic acid therapy strategies against COVID-19. *Int J Biol Sci.* 2022 Aug 1;18(13):5070-5085. <https://doi.org/10.7150/ijbs.72706>
 28. Kassiotis, G., Stoye, J. Immune responses to endogenous retroelements: taking the bad with the good. *Nat Rev Immunol* 16, 207–219 (2016). <https://doi.org/10.1038/nri.2016.27>
 29. Garde C, Pavlidis MA, Garces P... & Trolle T. Endogenous viral elements constitute a complementary source of antigens for personalized cancer vaccines. *NPJ Vaccines.* 2025 Mar 20;10(1):54. <https://doi.org/10.1038/s41541-025-01107-y>
 30. Russ E, Iordanskiy S. Endogenous Retroviruses as Modulators of Innate Immunity. *Pathogens.* 2023 Jan 19;12(2):162. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020162>
 31. Adler, G. L., Le, K., Fu, Y., & Kim, W. S. (2024). Human Endogenous Retroviruses in Neurodegenerative Diseases. *Genes*, 15(6), 745. <https://doi.org/10.3390/genes15060745>
 32. Priščáková P, Svoboda M, Feketová Z, Hutník J, Repiská V, Gbelcová H, Gergely L. Syncytin-1, syncytin-2 and suppressyn in human health and disease. *J Mol Med (Berl).* 2023 Dec;101(12):1527-1542. <https://doi.org/10.1007/s00109-023-02385-6>
 33. Garde, C., Pavlidis, M.A., Garces, P. *et al.* Endogenous viral elements constitute a complementary source of antigens for personalized cancer vaccines. *npj Vaccines* 10, 54 (2025). <https://doi.org/10.1038/s41541-025-01107-y>
 34. Gordon, D.E., Jang, G.M., Bouhaddou, M. *et al.* A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature* 583, 459–468 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2286-9>
 35. Cihan, P., Ozger, Z.B. & Cakabay, Z. Computational analysis of virus-host protein-protein interactions using gene ontology and natural language processing. *Appl Intell* 55, 393 (2025). <https://doi.org/10.1007/s10489-024-06223-1>

36. Ming, Z., Chen, X., Wang, S. et al. HostNet: improved sequence representation in deep neural networks for virus-host prediction. *BMC Bioinformatics* 24, 455 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12859-023-05582-9>
37. Bastien GE, Cable RN, Batterbee C, Wing AJ, Zaman L, Duhaimé MB. Virus-host interactions predictor (VHIP): Machine learning approach to resolve microbial virus-host interaction networks. *PLoS Comput Biol.* 2024 Sep 18;20(9):e1011649. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1011649>
38. Shang J., Peng Ch., Guan J., Cai D., Wang D., Sun Y. Computational approaches for virus host prediction: A review of methods and applications License: CC BY-NC-ND 4.0 arXiv:2509.00349v1 [q-bio.GN] 30 Aug 2025. <https://doi.org/10.48550/arXiv.2509.00349>
39. Ghosh S, Brown AM, Jenkins C, Campbell K. Viral Vector Systems for Gene Therapy: A Comprehensive Literature Review of Progress and Biosafety Challenges. *Appl Biosaf.* 2020 Mar 1;25(1):7-18. <https://doi.org/10.1177/1535676019899502>
40. Про державне регулювання генетично-інженерної діяльності та державний контроль за розміщенням на ринку генетично модифікованих організмів і продукції. Закон України від 23.08.2023 № 3339-IX Про державне регулювання ген... | від 23.08.2023 № 3339-IX (Терміни в документі) // Термінологія законодавства

1.29 ОЦІНКА ВПЛИВУ ЕЛЕКТРОМАГНІТНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА БІОСИНТЕЗ МОЛОЧНОЇ КИСЛОТИ МОЛОЧНОКИСЛИМИ БАКТЕРІЯМИ

Волошина І. М.¹, Кужель А. А.¹, Грецький І. О.^{1,2}

¹Київський національний університет технологій та дизайну

²Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України
ihorhretskyi@gmail.com

У роботі досліджено вплив електромагнітного випромінювання на біосинтез молочної кислоти молочнокислими бактеріями: накопичення молочної кислоти під час культивування. Застосовано підхід повнофакторного планування експерименту (3³), що дозволило охопити всі комбінації досліджуваних параметрів: потужності випромінювання, тривалості опромінення та тривалості культивування.

Встановлено, що тривалість культивування є найвпливовішим фактором, а її оптимальне значення становить 48 годин. Потужність мікрохвильового випромінювання впливає на процес у нелінійний спосіб, з максимальним стимулювальним ефектом при значеннях 0,001 та 0,1 мВт. Тривалість опромінення показала відносно невеликий вплив у межах варіації.

Ключові слова: *Lactobacillus acidophilus*, молочна кислота, електромагнітне випромінювання, біосинтез, оптимізація, повнофакторний експеримент.

Сучасний розвиток біотехнології та харчової промисловості зумовлює необхідність пошуку нових способів підвищення ефективності мікробіологічних процесів, зокрема біосинтезу органічних кислот [1]. Молочнокислі бактерії (МКБ) є ключовими мікроорганізмами для ферментаційних технологій, однак продуктивність їх метаболізму значною мірою визначається умовами культивування [2]. Стимулювання метаболічної активності МКБ має практичне значення, зокрема для скорочення часу ферментації і підвищення виходу продуктів, таких як молочна кислота (МК) – ключового метаболіту, що визначає кислотність, смакові якості та безпеку ферментованих продуктів [3]. Пошук факторів, які можуть модулювати ці процеси, включно з фізичними впливами, є актуальною темою сучасної мікробіології.

Одним із перспективних факторів впливу є електромагнітне випромінювання (ЕМВ), яке здатне змінювати фізіолого-біохімічні процеси клітин, активність ферментів та інтенсивність метаболічних шляхів [4, 5].

Вивчення впливу ЕМВ на біосинтез молочної кислоти дає змогу оптимізувати ферментаційні процеси, покращити вихід цільових продуктів та розширити можливості керування мікробними системами. Тому дослідження реакції молочнокислих бактерій на електромагнітні поля має вагоме наукове та практичне значення.

Метою даної роботи є оцінка впливу електромагнітного випромінювання різних параметрів на інтенсивність біосинтезу молочної кислоти молочнокислими бактеріями.

Об'єктом дослідження є молочнокислі бактерії у процесі культивування.

Предметом дослідження є вплив електромагнітного випромінювання різної інтенсивності та частоти на біосинтез молочної кислоти.

Методи та матеріали. У рамках дослідження було обрано бактерії роду *Lactobacillus*, що характеризуються вираженою молочнокислою активністю. Для проведення експериментів застосовували культуру *Lactobacillus acidophilus* УКМ В-2691, наданий Інститутом мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України. Зазначений штам зберігаються у фондах Української колекції мікроорганізмів та рекомендований для використання в наукових дослідженнях.

Культивування штаму *Lactobacillus acidophilus* УКМ В-2691 проводили в рідкому поживному середовищі MRS [6]. Інокуляцію проводили шляхом внесення 5% (об'єм/об'єм) добової активної культури у свіжоприготоване MRS-середовище. Посіви інкубували в стаціонарних умовах при температурі 37 °С протягом 96 годин.

Для дослідних зразків, які піддавалися дії електромагнітного випромінювання, вплив здійснювався одразу після посіву. Контрольні зразки культивували в ідентичних умовах без ЕМ-впливу. Після завершення інкубації визначали концентрацію продуктів метаболізму.

У дослідженні застосовували ЕМВ у діапазоні надзвичайно високих частот (НзВЧ), яке є представником неіонізуючих фізичних факторів із потенційною здатністю модифікувати біохімічні та фізіологічні характеристики мікроорганізмів. Експозицію здійснювали за допомогою серійного апарата резонансної терапії "MRTA-02" (№ 00533, "Радмір", Україна). Для проведення впливу використовували наступні експериментальні параметри: частота випромінювання - 61,22 ГГц; потужність ЕМВ 10^{-6} - 10^{-4} Вт; тривалість експозиції: 15, 30 та 60 хвилин залежно від дослідного варіанту.

Концентрацію молочної кислоти у культуральній рідині визначали методом Бюхнера. Для визначення значущих факторів та їх оптимальних значень для процесу отримання молочної кислоти при культивуванні використовувались методи математичної статистики. Накопичення МК оцінювали використовуючи методи регресіонного аналізу в теорії планування експерименту по повнофакторному плану 3^3 . Статистична обробка даних планованого експерименту (розрахунок коефіцієнтів регресії, дисперсійний аналіз (ANOVA) і побудова поверхонь відгуку проводилась з застосуванням тріал-версії програми Statistica (TIBCO Software Inc., <https://www.tibco.com/>) з використанням бібліотеки DOE. Отримані коефіцієнти вважалися статистично значущими при $p \leq 0,05$ [7].

Основним критерієм оптимізації у дослідженні виступала концентрація молочної кислоти в культуральному середовищі.

Незалежними змінними були наступні фактори: X_1 – потужність опромінення, мВт; X_2 – тривалість опромінення, хв; X_3 – тривалість культивування, години (табл. 1).

Таблиця 1. Фактори математичної моделі

| Позначення фактора | Фактор | Мінімальне значення «←» | Середнє значення «0» | Максимальне значення «+» |
|--------------------|----------------------------------|-------------------------|----------------------|--------------------------|
| X_1 | Потужність опромінення, мВт | 0,001 | 0,01 | 0,1 |
| X_2 | Тривалість опромінення, хв | 1 | 10 | 30 |
| X_3 | Тривалість культивування, години | 0 | 48 | 96 |

Усі досліди проводили в умовах електромагнітного екранування, що дозволяло мінімізувати зовнішні перешкоди та забезпечити точність параметрів. Дослідні зразки експонували ЕМВ одразу після інокуляції, у фазі адаптації (лаг-фази), що дозволяло оцінити вплив поля на початкові етапи росту та метаболізму молочнокислих бактерій.

Результати. У межах експериментальної частини дослідження було здійснено цілеспрямоване варіювання параметрів ЕМВ з метою встановлення впливу кожного з компонентів на інтенсивність біосинтезу МК молочнокислими бактеріями, а також виявлення можливих синергічних або антагоністичних ефектів між досліджуваними факторами.

Дослідження проводили відповідно до плану повного факторного експерименту 3^3 . Матриця планування експерименту згідно з планом повного факторного експерименту (ПФЕ) представляє собою набір комбінацій рівнів досліджуваних факторів, що забезпечує повне охоплення їх варіацій у межах заданих значень. Структура експериментального плану, а також комбінації рівнів досліджуваних факторів наведені у таблиці 2. Було проведено 27 варіантів експерименту, кожен з яких означав певну комбінацію факторів оптимізації, де оптимізаційним параметром слугувала концентрація МК в середовищі [4]. Незалежними змінними були наступні фактори: X_1 – потужність опромінення, мВт; X_2 – тривалість опромінення, хв; X_3 – тривалість культивування, години.

Узагальнені результати подано в таблиці 2, де наведено числові значення концентрацій МК, отриманих за різних комбінацій вхідних параметрів.

Результати числової обробки експериментальних даних подано у вигляді узагальненої таблиці дисперсійного аналізу (ANOVA), що наведена в табл. 3. Статистичну значущість кожного ефекту оцінювали за величинами F-критерію та відповідного p-рівня. Ефекти вважали достовірними при значеннях $p \leq 0,05$. Отримані результати дозволяють зробити висновки щодо сили та напрямку впливу кожного досліджуваного

чинника, а також сформувані основу для побудови адекватної математичної моделі біопроцесу.

Таблиця 2. Результати дослідження, отримані в межах реалізації повнофакторного плану експерименту

| № | Фактори оптимізації | | | Параметр оптимізації |
|----|---------------------|-------|-------|----------------------|
| | X_1 | X_2 | X_3 | |
| 1 | 0,001 | 1 | 0 | 0 |
| 2 | 0,001 | 1 | 48 | 12,761 |
| 3 | 0,001 | 1 | 96 | 9,413 |
| 4 | 0,001 | 10 | 0 | 0 |
| 5 | 0,001 | 10 | 48 | 13,947 |
| 6 | 0,001 | 10 | 96 | 10,435 |
| 7 | 0,001 | 30 | 0 | 0 |
| 8 | 0,001 | 30 | 48 | 10,183 |
| 9 | 0,001 | 30 | 96 | 6,702 |
| 10 | 0,01 | 1 | 0 | 0 |
| 11 | 0,01 | 1 | 48 | 5,791 |
| 12 | 0,01 | 1 | 96 | 6,726 |
| 13 | 0,01 | 10 | 0 | 0 |
| 14 | 0,01 | 10 | 48 | 12,737 |
| 15 | 0,01 | 10 | 96 | 5,115 |
| 16 | 0,01 | 30 | 0 | 0 |
| 17 | 0,01 | 30 | 48 | 7,488 |
| 18 | 0,01 | 30 | 96 | 6,199 |
| 19 | 0,1 | 1 | 0 | 0 |
| 20 | 0,1 | 1 | 48 | 11,975 |
| 21 | 0,1 | 1 | 96 | 10,608 |
| 22 | 0,1 | 10 | 0 | 0 |
| 23 | 0,1 | 10 | 48 | 15,794 |
| 24 | 0,1 | 10 | 96 | 6,831 |
| 25 | 0,1 | 30 | 0 | 0 |
| 26 | 0,1 | 30 | 48 | 13,535 |
| 27 | 0,1 | 30 | 96 | 8,363 |

Примітка: X_1 – потужність опромінення, мВт; X_2 – тривалість опромінення, хв; X_3 – тривалість культивування, години.

Таблиця 3. Результати дисперсійного аналізу (ANOVA) отриманих даних

| Фактор | SS | df | MS | F | p |
|-------------|----------|----|----------|----------|----------|
| X_1 | 31,3067 | 2 | 15,6533 | 8,4607 | 0,010619 |
| X_2 | 4,8628 | 2 | 2,4314 | 1,3142 | 0,320994 |
| X_3 | 567,8969 | 2 | 283,9484 | 153,4748 | 0,000000 |
| $X_1 * X_2$ | 6,5771 | 4 | 1,6443 | 0,8887 | 0,512523 |
| $X_1 * X_3$ | 21,9832 | 4 | 5,4958 | 2,9705 | 0,088876 |
| $X_2 * X_3$ | 26,9672 | 4 | 6,7418 | 3,6440 | 0,056491 |
| Помилка | 14,8010 | 8 | 1,8501 | | |
| Тотальна SS | 741,2347 | 26 | | | |

Результати дисперсійного аналізу (ANOVA) свідчать про те, що потужність НЗВЧ опромінення (X_1) та тривалість культивування (X_3) мають статистично достовірний вплив на рівень накопичення молочної кислоти бактеріями *Lactobacillus acidophilus*. Обидва фактори продемонстрували високий рівень значущості, що підтверджується р-значенням $\leq 0,001$. Це вказує на те, що зміни в цих параметрах суттєво впливають на інтенсивність біосинтезу цільового метаболіту, і можуть розглядатися як ключові регуляторні змінні у подальшій оптимізації умов культивування.

Для зручності візуального аналізу впливу факторів на відгук системи на рис. 1 подано діаграму Парето, яка відображає впорядковану за спаданням абсолютної величини шкалу ефектів змінних. Дана діаграма дозволяє наочно і швидко оцінити, які саме фактори або їх комбінації справляють найсуттєвіший вплив на досліджуваний показник — у цьому випадку, на рівень біосинтезу МК.

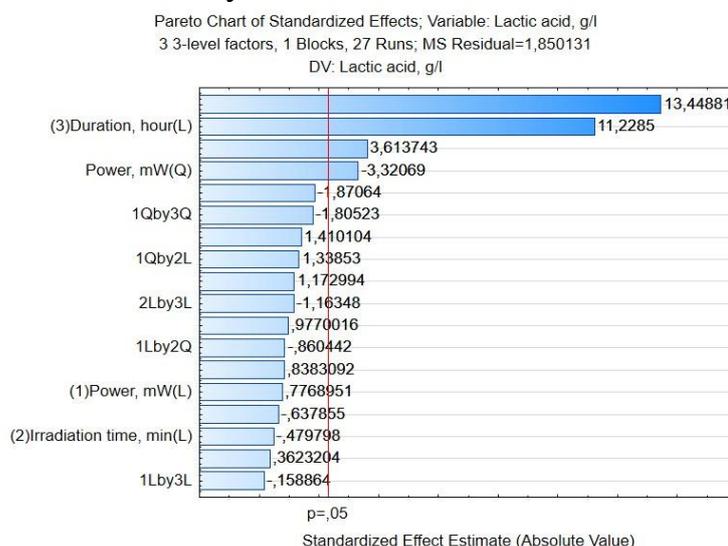


Рис. 1. Вплив досліджуваних факторів на біосинтез МК у *L. acidophilus*

Для порівняння впливу ЕМВ на біосинтез при різній тривалості культивування розглянемо рис 2.

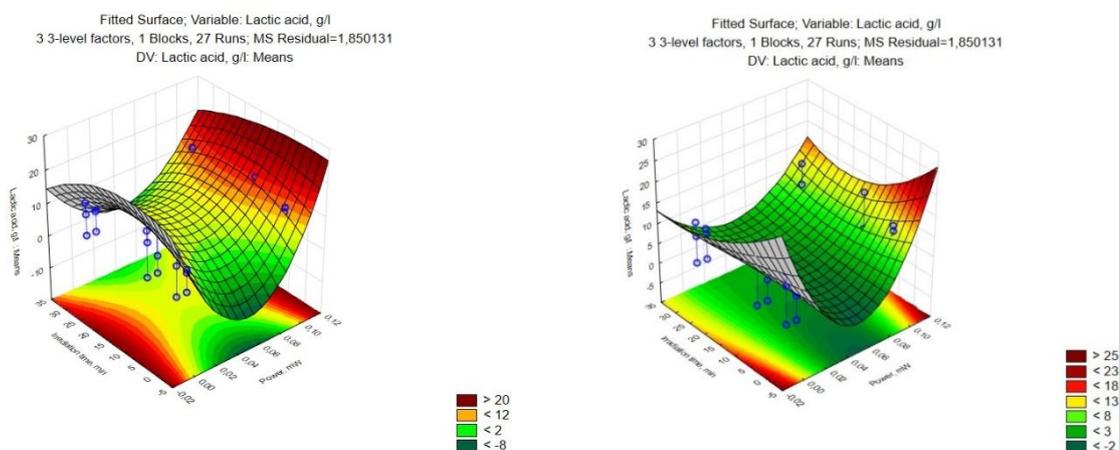


Рис. 2. Вплив потужності ЕМВ та тривалості опромінення на біосинтез МК при 48 та 96 годинах культивування

Порівняльний аналіз двох поверхонь відгуку, побудованих на основі регресійної моделі для оцінки впливу потужності мікрохвильового опромінення та тривалості його застосування, продемонстрував суттєву різницю у динаміці біосинтезу молочної кислоти залежно від тривалості культивування. При 48 годинах культивування спостерігається чітко виражений максимум концентрації молочної кислоти у зоні поєднання високої потужності (0,1–0,12 мВт) та короткочасного опромінення (менше 5 хвилин). Така конфігурація параметрів свідчить про стимулювальний ефект сублетальних доз електромагнітного випромінювання на метаболічну активність *Lactobacillus acidophilus* у фазі логарифмічного росту.

Натомість при 96 годинах культивування форма поверхні бажаності змінюється: хоча високі концентрації молочної кислоти все ще фіксуються у зоні максимальних значень потужності, амплітуда відповіді є помітно меншою, а сама поверхня більш згладженою. Це свідчить про зниження чутливості бактерій до параметрів опромінення на пізніших етапах життєвого циклу, ймовірно внаслідок переходу клітин у стаціонарну або деградаційну фазу, виснаження поживних речовин та накопичення інгібуючих метаболітів.

Для визначення оптимальних значень досліджуваних факторів проведемо оцінку профілів передбачених значень концентрації молочної кислоти та функції бажаності за трьома факторами оптимізації.

На рисунку рис. 3 представлено графічне зображення профілів для передбачених (прогнозованих) значень залежної змінної — концентрації молочної кислоти (г/л) — та функції бажаності (desirability) в залежності від варіацій трьох незалежних факторів: потужності мікрохвильового опромінення (Power, mW), тривалості опромінення (Irradiation time, min) та тривалості культивування (Duration, hour).

Рисунок 3 ілюструє взаємозв'язок між трьома ключовими факторами – потужністю опромінення НЗВЧ, тривалістю опромінення та тривалістю культивування – й очікуваними значеннями концентрації молочної кислоти, а також відповідною функцією бажаності.

З графіка видно, що потужність мікрохвильового випромінювання чинить нелінійний вплив на синтез молочної кислоти. При найнижчому значенні потужності (0,001 мВт) та найвищому (0,1 мВт) прогнозовані концентрації молочної кислоти є вищими, ніж при середньому рівні потужності (0,01 мВт), де спостерігається найменший вихід. Це може свідчити про наявність адаптивної реакції клітин на граничні значення випромінювання, які, залежно від рівня, можуть діяти як слабкий стимул чи навпаки як стресовий чинник, що активує захисні метаболічні шляхи.

У свою чергу, тривалість опромінення НЗВЧ продемонструвала значно менш виражений вплив. Незважаючи на те, що при 15,5 хвилинах значення концентрації дещо підвищується, загальна варіабельність виходу молочної кислоти залишається в межах невеликих коливань. Така динаміка свідчить про відносну толерантність системи до змін цього параметра в межах досліджуваного інтервалу. Таким чином, тривалість опромінення,

Ймовірно, не є визначальним фактором у модифікації метаболізму *Lactobacillus acidophilus* за умов проведеного експерименту.

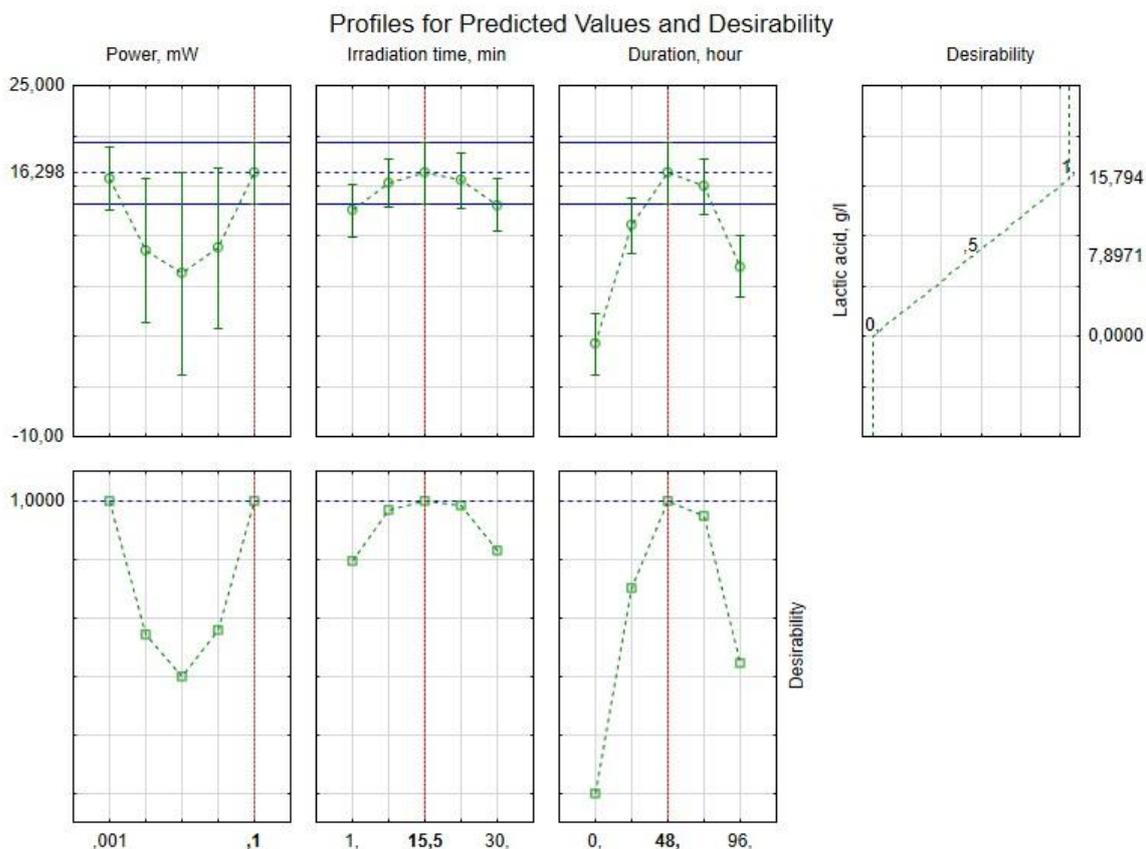


Рис. 3. Профілі прогнозованих значень факторів для отримання максимальної кількості МК у *L. acidophilus*

Найбільш чітка й інформативна залежність виявлена для тривалості культивування. Спостерігається стрімке зростання концентрації молочної кислоти з 0 до 48 годин, після чого фіксується зниження цього показника при продовженні процесу до 96 годин. Це підтверджує припущення про те, що 48-годинний період є оптимальним з точки зору метаболічної активності бактерій, оскільки саме в цей час накопичується максимальна кількість цільового продукту. Подальше культивування, ймовірно, супроводжується зниженням темпів ферментації внаслідок виснаження поживних речовин або дії вторинних метаболітів.

Таким чином, аналіз профілів передбачених значень і бажаності підтверджує визначальну роль тривалості культивування як домінуючого фактора, водночас демонструючи складну й неоднозначну поведінку системи у відповідь на зміну параметрів мікрохвильового впливу. Отримані результати можуть бути використані для точного налаштування режимів ферментації з метою максимізації продуктивності синтезу МК.

Висновки. У ході експериментальних досліджень проведено варіювання трьох основних факторів: потужності мікрохвильового опромінення, тривалості опромінення та тривалості культивування. Було зібрано повнофакторну матрицю експерименту за планом 3^3 , що дало

змогу оцінити не лише індивідуальний, а й комбінований вплив параметрів на продукцію молочної кислоти.

Найбільший достовірний вплив ($p \leq 0,01$) на рівень синтезу молочної кислоти продемонстрував фактор тривалості культивування, для якого встановлено оптимальне значення 48 годин. Потужність опромінення також має статистично значущий, хоча й менш виражений вплив. Тривалість опромінення показала мінімальну варіабельність впливу у межах досліджуваного діапазону.

Побудовані графіки поверхонь відгуку та функції бажаності виявили зони оптимуму параметрів: 0,1 мВт (потужність), 15,5 хв (тривалість опромінення) та 48 год (тривалість культивування). Саме така комбінація умов забезпечує максимальну продуктивність *L. acidophilus* щодо синтезу молочної кислоти.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Lactic Acid Bacteria in Preservation and Functional Foods / I. Salmerón et al. *Food Microbiology and Biotechnology*. 2020. P. 137–161. <https://doi.org/10.1201/9780429322341-8>
2. Papadimitriou K. et al. Stress physiology of lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2016. P. 837-90. doi: 10.1128/MMBR.00076-15
3. Adeyemo S. M., Awojobi K. O., Ogunlusi E. D. Biosynthesis of Enzymes in Fermented Foods by Lactic Acid Bacteria and Possible Use as Bio-Preservative in Fermented Milk. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*. 2018. Vol. 19, no. 3. P. 1–11. <https://doi.org/10.9734/jabb/2018/42971>
4. Soghomonyan D., Trchounian A. Comparable Effects of Low-Intensity Electromagnetic Irradiation at the Frequency of 51.8 and 53 GHz and Antibiotic Ceftazidime on *Lactobacillus Acidophilus* Growth and Survival. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2013 Vol. 67. №. 3. P. 829–35. doi:10.1007/S12013-013-9571-2
5. Goodman E. M., Greenebaum B., Marron M. T. Effects of Electromagnetic Fields on Molecules and Cells. *International Review of Cytology*. 1995. P. 279–338. URL: [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)62489-4](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)62489-4)
6. Грецький І.О., Волошина І. М. Оптимізація поживного середовища для отримання молочної кислоти. Інноватика в освіті, науці та бізнесі: виклики та можливості : матеріали V Всеукраїнської конференції здобувачів вищої освіти і молодих учених, м. Київ, 15 листопада 2024 року. Т.1. Київ : КНУТД, 2024. С. 253-257.
7. Lazic Z. R. Design of Experiments in Chemical Engineering: A Practical Guide. Wiley-VCH, 2005. P 350– 360.

1.30 ОЧИЩЕННЯ СТИЧНИХ ВОД ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ СІРКО-ОКИСНЮВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ

Савицька К. В., Давидюк Д. А.

Київський національний університет технологій та дизайну

savickaakarina120@gmail.com

Робота присвячена вивченню потенціалу застосування сірко-окиснювальних бактерій в екологічній біотехнології. Представлена стисла характеристика та особливості застосування сірко-окиснювальних бактерій, пропонованих для очищення стічних вод підприємств різних галузей.

Ключові слова: *сірко-окиснювальні бактерії, стічні води, очищення, ресурсозбереження.*

Сірко-окиснювальні бактерії входять до групи прокаріотичних мікроорганізмів, здатних забезпечувати свій ріст шляхом отримання енергії через процес окиснення відновлених неорганічних сполук сірки, включаючи: сірководень, елементарну сірку, тіосульфат, сульфід. Кінцевим продуктом вказаного окиснення зазвичай є сульфат. Група включає як облигатно аеробні організми, що потребують кисню для своєї життєдіяльності, так і анаеробні фототрофні бактерії, які отримують енергію через фотосинтез, але для окиснення субстратів використовують сірку (наприклад, *Thiobacillus*, *Acidithiobacillus*, *Beggiatoa*, *Chlorobium*, *Allochromatium* тощо). Ці організми поширені у широкому спектрі екологічних ніш, включаючи ґрунт, морські і прісноводні екосистеми, гідротермальні джерела, а також екстремальні умови з високою кислотністю (наприклад, шахтні дренажні води з підвищеним вмістом кислоти). Бактерії здатні окиснювати токсичні відновлені сполуки сірки, зокрема сірководень, до менш токсичних форм, таких як сульфат. Отримані сульфати можуть бути засвоєні рослинами або слугувати джерелом субстрату для сульфатредукуючих бактерій. Сірко-окиснювальні бактерії використовують також у процесах біовилуговування або у біоремедіаційних заходах, для очищення стічних вод від сірковмісних забруднювачів, включаючи сірководень.

Сульфідне забруднення може утворюватися у стічних водах шкіряних підприємств або віскозного виробництва, підприємств текстильної, паперової, фармацевтичної промисловостей, видобувної галузі тощо [1].

Наявність у стічних водах сульфідів супроводжується негативними наслідками, що проявляються у корозійному впливі на конструкції, значному підвищенні хімічного споживання кисню, що спричиняє дефіцит кисню у водних екосистемах після надходження забруднених вод, погіршенні загального стану навколишнього середовища, появі сильного

неприємного запаху. Знешкодження вказаних стічних вод здійснюється за допомогою низки хімічних та фізичних методів, включаючи попередню нейтралізацію стічних вод з подальшим видаленням сірководню [2]. Однак, у наш час вважають, що застосування біологічних методів очищення стічних вод є більш ресурсощадним та економічно вигідним. А використання для очищення сірко-окислювальних бактерій робить технологію очищення високоефективною. Так, біологічне очищення лужних сірковмісних стічних вод може бути здійснене у закритому аеротенку за умови використання культури сірко-окиснювальних бактерій, іммобілізованих на плаваючих гранулах, виготовлених із поліетилену високого тиску [3]. Перетворення сульфідів у стічних водах в нерозчинну молекулярну сірку замість сульфатів спостерігається при застосуванні видів *Thiobacillus*. Отримана сірка може слугувати цінною хімічною сировиною, а метод є енергоощадним з мінімізацією отримання побічних продуктів. Значну перспективу має також двоступеневий метод утилізації сірковмісних вод. На першому етапі у аеробному реакторі відбувається біохімічне перетворення сульфідів у елементарну сірку за участю кисню і бактерій, що окислюють сульфідів. Надалі у другому аеробному реакторі ця сірка окиснюється до сульфатів. Ефективність процесу підвищується при використанні іммобілізованої біомаси бактерій родів *Thiobacillus* і *Thiomicrospira* на таких носіях, як поліуретан, поліетилен, поліпропілен або поліхлорвініл. Сучасні підходи також включають використання мембранних біореакторів для біологічної обробки сірковмісних стічних вод шкіряної промисловості. Дослідження стосуються біодеградації нафталін-сульфонатів і бензотіазолів у стічних водах за допомогою мембранного біореактора з ультрафільтрацією на поверхні [4].

Процеси окиснення відновлених сполук сірки у аеробних зонах очисних споруд біологічного очищення здійснюються за участю безколірних і фототрофних сірчаних бактерій, а також певних гетеротрофних мікроорганізмів. Серед сірко-окиснювальних бактерій, що розвиваються за помірних температур, найбільш поширеними є представники родів *Thiobacillus* (наприклад, *Th. thioparus*, *Th. denitrificans*), *Thiomicrospira* і *Thiosphaera*. Однак встановлено, що автотрофні сірко-окиснювальні бактерії домінують переважно в специфічних середовищах із підвищеним вмістом сульфідів, таких як стічні води підприємств, пов'язаних із видобуванням сульфідних руд. У середовищах із низькими концентраціями відновлених сполук сірки провідну роль в їхньому окисненні відіграють факультативні літотрофи та гетеротрофи, які краще пристосовані до нестабільних умов існування. Серед сірко-окиснювальних бактерій виділяють представників різних груп *Paracoccus*, *Hyphomicrobium*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Ochrobactrum* та *Hydrogenobacter* [5].

Гетеротрофні мікроорганізми, що окиснюють сполуки сірки в аеробних зонах, переважають на тих ділянках очисних споруд, де

концентрація сірководню порівняно невелика, а надходження органічних речовин зі стічними водами відбувається інтенсивно [6].

Крім розглянутих вище, до сірко-окиснювальних мікроорганізмів очисних споруд входять також безбарвні родів *Beggiatoa* і *Thiothrix*, а також *Macromonas* і *Thiospira*. Для процесу очищення стічних вод безбарвні сірчані бактерії цінні тим, що, на відміну від тіонових бактерій, вони окиснюють переважно сульфіди. Характерними фізіологічними особливостями сірчанних бактерій *pp. Thiothrix* і *Beggiatoa* є повільне споживання субстрату і, відповідно, толерантність до високого вмісту розчинених органічних забруднювальних речовин в навколишньому середовищі, більш високий рівень метаболізму і більш висока стійкість до впливу токсинів у порівнянні з гетеротрофною мікрофлорою. Для нитчастих бактерій характерні тонкі нитки діаметром 1-40 мкм, тому вони забезпечуються розчиненим киснем краще, ніж бактерії у флокулах, що дозволяє їм успішно виживати в умовах дефіциту розчиненого кисню. Особливо багато їх при недостатній аерації, так як вони здатні отримувати енергію, окислюючи сірководень до сірки [7].

В зонах біологічних очисних споруд, що характеризуються зниженим вмістом кисню, можуть мешкати окремі види сірко-окислювальних бактерій (*Thiomicrospira denitrificans*, *p. Beggiatoa*, *p. Thiospira*, *p. Thiovulum*), схильних до мікроаерофілії аеробів, факультативних або аеротолерантних анаеробів. Деякі пурпурові сірчані та пурпурові несірчані бактерії в даних умовах здатні також здійснювати метаболізм сполук сірки, перемикаючись за відсутності світла з типового для них анаеробного фотосинтезу на кисневий обмін. Дослідження показали, що факультативно-анаеробні несірчані пурпурові бактерії роду *Rhodopseudomonas*, особливо *Rh. sulfidophila*, *Rh. palustris* і *Rh. capsulate*, можуть окиснювати сульфід або тіосульфат не тільки на світлі, але і в темряві при доступі кисню і при обов'язковій наявності органічних сполук.

Висновки. Дослідження використання сірко-окиснювальних бактерій для очищення стічних вод є одним із найперспективніших напрямів сучасної біотехнології. Це пов'язано з тим, що згадані технології спрямовані не на нейтралізацію забруднювача, а на отримання побічного продукту, корисного для промисловості. Біотехнологічні підходи дозволяють підібрати для кожного окремого випадку штами бактерій, які витримують високі концентрації солей, або низький рівень рН, або високі температури, що робить очищення специфічних за складом стоків ефективним і ресурсощадним.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Pokorna, D., & Zabranska, J. (2015). Sulfur-oxidizing bacteria in environmental technology. *Biotechnology Advances*, 33(6), 1246-1259. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.007>
2. Стрілець О. П., Калюжная О. С., Івахненко О. Л., Каплієва К. А., Стрельников Л. С. Біологічна очистка стічних вод – захист водних ресурсів України. *Фітогормони, гумінові речовини та інші біологічно активні сполуки для сільського господарства*,

здоров'я людини і охорони навколишнього середовища : Мат-ли доп. ІХ Міжн. конф. 2013, 7–10 жовтня 2013 року, Львів : Видавництво Львівської політехніки, 2013. С. 141–142.

3. Grabovich, M. Y., Patrietskaya, V. Y., Muntyan, M. S., & Dubinina, G. A. (2001). Lithoautotrophic growth of the freshwater strain *Beggiatoa* D-402 and energy conservation in a homogeneous culture under microoxic conditions. *FEMS microbiology letters*, 204(2), 341-345.

4. Nelson, D. C. (1989). Physiology and biochemistry of filamentous sulfur bacteria. *Autotrophic bacteria*, 219-238.

5. Fan, K., Wang, W., Xu, X., Yuan, Y., Ren, N., Lee, D. J., & Chen, C. (2023). Recent advances in biotechnologies for the treatment of environmental pollutants based on reactive Sulfur species. *Antioxidants*, 12(3), 767.

6. Pokorna, D., & Zabranska, J. (2015). Sulfur-oxidizing bacteria in environmental technology. *Biotechnology Advances*, 33(6), 1246-1259.

7. Huber, B., Herzog, B., Drewes, J. E., Koch, K., & Müller, E. (2016). Characterization of sulfur oxidizing bacteria related to biogenic sulfuric acid corrosion in sludge digesters. *BMC microbiology*, 16(1), 153.

1.31 БЛОК USP1: СУБКЛІТИННА ЛОКАЛІЗАЦІЯ, ДОМЕННА СТРУКТУРА ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ АСПЕКТИ УЧАСТІ В ПАТОГЕНЕЗІ ХРОНІЧНОЇ МІЄЛОЇДНОЇ ЛЕЙКЕМІЇ

Матвієнко А. С.^{1,2}, Антоненко С. В.¹, Гур'янов Д. С.¹,
Телегєєв Г. Д.¹

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
²Київський національний університет технологій та дизайну
matvieienkoayastasia@gmail.com

Основним завданням даної роботи було систематизувати знання, щодо субклітинної локалізації білка USP1 та його колокалізації з онкобілком *Vcr-Abl*, створити рекомбінантні генетичні конструкції *pEGFP-C3-USP1-domain-1* і *pEGFP-C3-USP1-domain-2*, необхідні для вивчення структурних та функціональних особливостей доменної організації білка USP1.

Ключові слова: деубіквітіназа USP1, онкобілок *Vcr-Abl*, хронічна мієлоїдна лейкемія, генетичні конструкції *pEGFP-C3-USP1-domain-1* та *pEGFP-C3-USP1-domain-2*.

Хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ) є клональним мієлопроліферативним захворюванням, розвиток якого зумовлений утворенням філадельфійської хромосоми та експресією онкопротеїну *Vcr-Abl*. Цей химерний білок із конститутивною тирозинкіназною активністю відіграє ключову роль у патогенезі ХМЛ, спричиняючи надмірну проліферацію лейкемічних клітин, порушення клітинної диференціації та зниження чутливості до апоптозу. Незважаючи на високу ефективність інгібіторів тирозинкінази, розвиток резистентності до існуючих лікарських засобів залишається суттєвою клінічною проблемою, що зумовлює необхідність пошуку нових молекулярних мішеней та допоміжних терапевтичних підходів [1, 2].

Одним із важливих регуляторів стабільності онкопротеїну *Vcr-Abl* є деубіквітинуючий фермент USP1 (ubiquitin-specific protease 1). USP1 здійснює деубіквітинування *Vcr-Abl*, запобігаючи його убіквітин-протеасомній деградації та, таким чином, підтримуючи онкогенний потенціал лейкемічних клітин. Фармакологічне інгібування USP1 призводить до підвищення рівня убіквітинування *Vcr-Abl*, активації протеасомозалежного протеолізу та зниження проліферативної активності клітин ХМЛ. У зв'язку з цим USP1 розглядається як перспективна терапевтична мішень, інгібування якої може підсилувати ефективність інгібіторів тирозинкінази та зменшувати ризик розвитку резистентності до лікарських засобів. Крім того, рівень експресії USP1 потенційно може бути використаний як біомаркер прогресії захворювання та відповіді на терапію [3, 4, 5, 6].

Незважаючи на зростаючий інтерес до функціональної ролі USP1,

особливості його доменної організації та внесок окремих доменів у реалізацію біологічних функцій білка, зокрема у взаємодію з Vcr-Abl, залишаються недостатньо вивченими. У цьому контексті створення рекомбінантних генетичних конструкцій, що забезпечують окрему експресію функціональних доменів USP1, є важливим інструментом для поглибленого аналізу структурно-функціональних характеристик цього ферменту.

Метою дослідження є визначення субклітинної локалізації білка USP1 та його колокалізації з онкобілком Vcr-Abl у клітинах хронічної мієлоїдної лейкемії, а також створення рекомбінантних генетичних конструкцій pEGFP-C3-USP1-domain-1 і pEGFP-C3-USP1-domain-2 як інструментів для вивчення структурних і функціональних особливостей доменної організації білка USP1.

Об'єктом дослідження є деубіквітинуючий фермент USP1, зокрема його доменна структура, субклітинна локалізація та колокалізація з онкобілком Vcr-Abl у клітинах ХМЛ.

Предметом дослідження були рекомбінантні генетичні конструкції pEGFP-C3-USP1-domain-1 та pEGFP-C3-USP1-domain-2, а також структурні особливості білків, що експресуються на їх основі.

Методи та матеріали

Культивування клітинних ліній людини.

Культивування здійснювали відповідно до рекомендацій American Type Culture Collection (ATCC). Клітини K562 (хронічна мієлоїдна лейкемія людини) та HEK-293 (ембріональна нирка людини) підтримували в стандартних умовах культивування при температурі 37°C в атмосфері з 5 % CO₂ із використанням поживних середовищ, рекомендованих виробником для відповідних клітинних ліній [7, 8, 9].

Трансфекція клітин 293Т. Трансфекцію клітин HEK293 проводили за допомогою поліетиленіміну (Sigma, США) згідно рекомендацій виробника [10].

Дослідження субклітинної локалізації USP1 та колокалізації Vcr-Abl у клітинах HEK293 та K562.

Клітини фіксували 4% розчином формальдегіду. Пермеабілізацію здійснили за допомогою розчину Triton X-100. Неспецифічне зв'язування антитіл пригнічували, інкубуючи зразки у розчині 1% бичачого сироваткового альбуміну. Потім клітини інкубували із специфічними первинними антитілами у відповідному розведенні, промивали та додавали відповідні флуоресцентно мічені вторинні антитіла. Фарбування ядер проводили за допомогою DAPI (Thermo Fisher Scientific, США). Препарат на скельцях полімеризували з використанням CitiFluor™ AF1, Mounting Medium «Science Services» (Німеччина) та вивчали за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопу «Zeiss LSM 510 Meta» (Німеччина), з імерсійним об'єктивом 100x1.25 N.A та програмою «LSM Browser». Кількісний аналіз колокалізації між двома білками здійснили з використанням коефіцієнту кореляції Пірсона та коефіцієнту кореляції

Мандерса за допомогою програмного забезпечення Fiji ImageJ (плагіна JACoP).

Ампліфікація цільових послідовностей доменів гена *USP1*.

Для ампліфікації кодуєчих послідовностей доменів гена *USP1* були підібрані праймери, послідовності яких вказані в табл. 1. Підбір праймерів здійснювали за допомогою програми Serial Cloner 2.6.1.

Таблиця 1. Праймери використані для ампліфікації цільових послідовностей гена *USP1*

| Цільові послідовності гена <i>USP1</i> | Праймери: |
|--|--|
| USP1- domain-1: | Fwd – GACGAGCTGTACAAGTACTCAG |
| | Rev – attagtcgacATGACTGGTGTTCCTTGGATAAT |
| USP1- domain-2: | Fwd – gagtcgaccGAAGTTAAACCCATAAACAAAGGTG |
| | Rev – TCAGTTATCTAGATCCGGTGGA |

Матрицею для підбору праймерів та ПЛР слугувала генетична конструкція рЕСFP-С3-USP1, що містить кДНК цільових послідовностей. ПЛР проводили за допомогою ПЛР-ампліфікатора Eppendorf Master Cycler Personal (США). Компоненти ПЛР відповідали умовам виробника (Thermo Scientific) з використанням високоточної Pfu-полімерази. ПЛР проводили за наступних умов: початкову денатурацію ДНК – 5 хв при 95°C. Денатурація ДНК – 30 с при 95°C. Відпал праймерів – 30 с при 60°C. Елонгація тривала 1 хв при 72°C. Для напрацювання ДНК в необхідній кількості стадії 2-4 повторювали 29 разів. Кінцева елонгація проводилась 5 хв при 72°C. Успішність ампліфікації оцінювали за допомогою електрофорезу в агарозному гелі за стандартних умов [11, 12].

Виділення ампліфікованих фрагментів ДНК із агарозного геля.

Виконали електрофоретичне розділення нуклеїнових кислот в агарозному гелі, визначили розміри і розташування фрагментів ДНК та вирізали з гелю смужку, яка несе цільовий фрагмент. Гель з фрагментом ДНК зважили та додали трикратний об'єм (3X) адсорбційного буфера (5,0 М СН₆N₄S - 29,54 г, 1 М розчину СН₃COOK - 0,83 мл, 20 мМ EDTA (0,5 М розчину 2,0 мл, рН 8.0), 5% Triton X-100 - 2,5 мл) [13]. Суміш інкубували 10 хв при 50°C. Отриману суспензію вносили до колонки Whatman GF/C зі скловолоконними фільтрами з діаметром пор 1.2 μm та центрифугували при 8 000 g 2 хв [14]. Отриманий осад промивали буфером для відмивки (1М Tris (рН 7.5) -2,5 мл, 0,5 М EDTA (рН 8.0) - 1 мл, 5М NaCl - 2мл, 96% етанол - 26,04 мл) та 96% етанолом [15]. ДНК елюювали дистильованою водою, концентрацію визначали спектрофотометрично [11, 12].

Отримання генетичних конструкцій.

Створення генетичних конструкцій для експресії цільових послідовностей та рестрикційний аналіз були змодельовані програмою Serial Cloner 2.6.1. Для клонування кодуєчих послідовностей доменів *USP1* був

використаний вектор pECFP-C3 (Clontech, США), який у кількості 5 мкг обробляли однією одиницею по 0,3 мкл (3 U) відповідних рестриктаз. Ампліфіковану кодуючу послідовність USP1-domain-1 інкубували з ендонуклеазами BamHI (Thermo Fisher Scientific, США) та Sall (Thermo Fisher Scientific, США). Після цього вставку USP1-domain-1 лігували у вектор pECFP-C3, який попередньо був порізаний за сайтами рестрикції Sall та BglI. Для створення генетичної конструкції pECFP-C3-USP1-domain-2 вектор pECFP-C3 обробили ендонуклеазами рестрикції BamHI та Sall. Ампліфіковану кодуючу послідовність USP1-domain-2 інкубували з ендонуклеазами BamHI та Sall. За допомогою інструменту Double Digest Calculator визначили оптимальні умови проведення реакції рестрикції та підбрали буферні розчини. Для рестриктаз Sall та BglI використовувався стандартний однократний Orang-буфер (Thermo Fisher Scientific, США), для BamHI та Sall – двократний Tango-буфер (Thermo Fisher Scientific). Рестрикційна суміш інкубувалась впродовж години при 37°C з подальшою термоінактивацією при 80°C протягом 20 хвилин. Для проведення лігування було використано молекулярне співвідношення вектора до вставки 1:3. До складу реакційної суміші було внесено: 200 ng плазмідної ДНК, 600 ng USP1-domain-1 та USP1-domain-2 відповідно, 5 U T4-ДНК-лігази (Thermo Fisher Scientific, США), 0,5 mM АТФ, однократний (1X) лігазний буфер. Реакцію проводили впродовж 24 годин при 20°C з наступною 20-хвилинною інактивацією при 75°C, додаванням ферменту-кілера EcoRI до суміші, де це необхідно, інкубацією 30 хвилин при 37°C з наступною 20-хвилинною інактивацією при 65°C. Для проведення контролю була проведена реакція лігування, але без вставки доменів у вектор [11, 12].

Отримання компетентних клітин.

Для підготовки компетентних клітин використовували штам *Escherichia coli* TOP10 (Agilent Technologies, США). Нічну культуру (500 мкл) інокулювали у 50 мл середовища LB (1% NaCl, 1% триптон, 0,5% дріжджовий екстракт) у співвідношенні 1:100 і культивували при 37 °C до OD₆₀₀ ≈ 0,3. Культуру охолоджували на льоду, центрифугували при 4 °C, 8 000 g, ресуспендували у 0,1 M CaCl₂ та інкубували на льоду 30 хв. Після повторного центрифугування клітини ресуспендували у 500 мкл 0,1 M CaCl₂. Всі операції виконували при низьких температурах для збереження життєздатності та високої трансформаційної здатності клітин [16, 17].

Трансформація.

Лігазну суміші об'ємом не більше 5% від загального об'єму аліквоти вносили до компетентних клітин, які попередньо були витримані на льоду 10 хв, перемішували та інкубували на льоду 30 хв. Тепловий шок проводили при 42 °C протягом 90 с, після чого пробірки охолоджували 2 хв на льоду. Додавали середовище LB та інкубували 40 хв при 37 °C з постійним перемішуванням. Культуру центрифугували при 8 000 – 10 000 g, 2 хв та висівали на чашки Петрі з LB-агаром і 12,5 мкг канаміцину. Інкубували 10–12 год при 37 °C, після чого аналізували колонії. Відібрані колонії культивували в рідкому середовищі LB з

100 мкг/мл канаміцину протягом 18 год, а плазміди виділяли методом лізису неіонними детергентами [11, 12].

Виділення плазмід методом лізису неіонними детергентами (NID). Культуру клітин центрифугували протягом 1 хв при 7 000 g. Надосад видалляли, а до осаду, який становили бактеріальні клітини додавали неіонний детергент (NID) (5% сахарози, 30 мМ ЕДТА, 50 мМ Tris (рН 8.0), 0,75 М NH₄Cl, 0,5% Triton X-100, 100 мкг/мл лізоцим та 25 мкг/мл РНКаза А), ретельно перемішували за допомогою вортекс та залишали на 5 хв на водяній бані з температурою +65°C. Суспензію центрифугували 40 хв при 13 000 g, супернатант обробляли ізопропанолом і центрифугували 20 хв при 13 000 g. Осад промивали 1 мл 70% етанолом, центрифугували 5 хв при 13 000 g, сушили та розчиняли у дистильованій воді [11, 12, 18].

Рестрикційний аналіз генетичних конструкцій pECFP-C3-USP1-domain-1 та pECFP-C3-USP1-domain-2. Перевірку на наявність вставки у векторі було виконано методом аналітичного розрізання ендонуклеазами рестрикції за умовами виробника. Аналіз pECFP-C3-USP1-domain-1 здійснили за допомогою ендонуклеаз рестрикції SalI та PstI (Thermo Fisher Scientific, США). Генетичну конструкцію pECFP-C3-USP1 domain-2 вивчали за допомогою – EcoRI (Thermo Fisher Scientific, США).

Результати

Особливості субклітинної локалізації деубіквітинази USP1. Субклітинна локалізація білків є одним із ключових чинників, що визначають реалізацію їхніх біологічних функцій, формування білок-білкових взаємодій та залученість до критичних процесів клітини. Для деубіквітинуючих ферментів, зокрема USP1, просторове розміщення у клітині має особливе значення, оскільки процеси убіквітинування та деубіквітинування тісно пов'язані з регуляцією стабільності, активності та локалізації білкових субстратів.

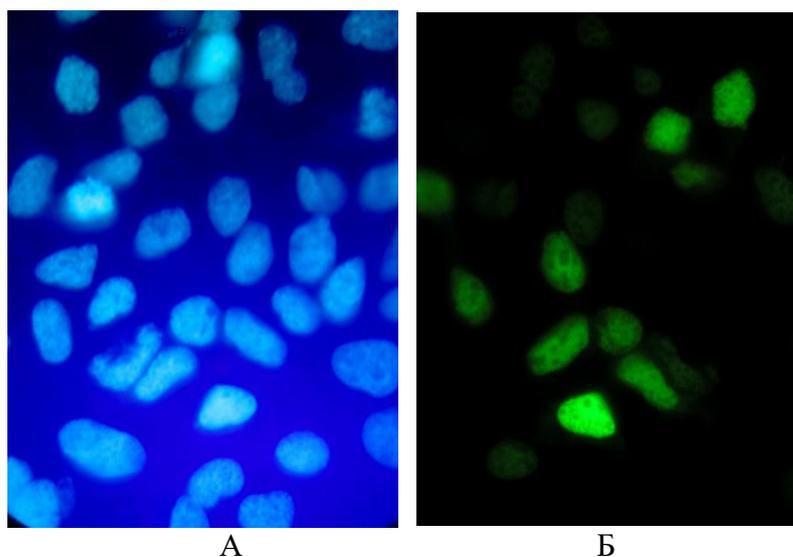


Рис. 1. Ядерна локалізація рекомбінантного білка USP1 у клітинах HEK293. А – ядра клітин забарвлені ДНК-зв'язувальним барвником DAPI (синє). Б – експресія pECFP-C3-USP1 (зелене). Флуоресцентна мікроскопія, x100 [19]

Експериментальні дані, отримані в еукаріотичній клітинній системі НЕК293Т (рис.1), K562 (рис. 2) свідчать, що USP1 переважно локалізується в ядрі клітини, що узгоджується з його відомою участю в регуляції процесів репарації ДНК та ядерних білкових комплексів [19]. Хоча у клітинах раку простати значна частина білка USP1 локалізується у цитоплазмі, що може свідчити про дерегуляцію функцій та участь в онкопроцесі [20, 21].

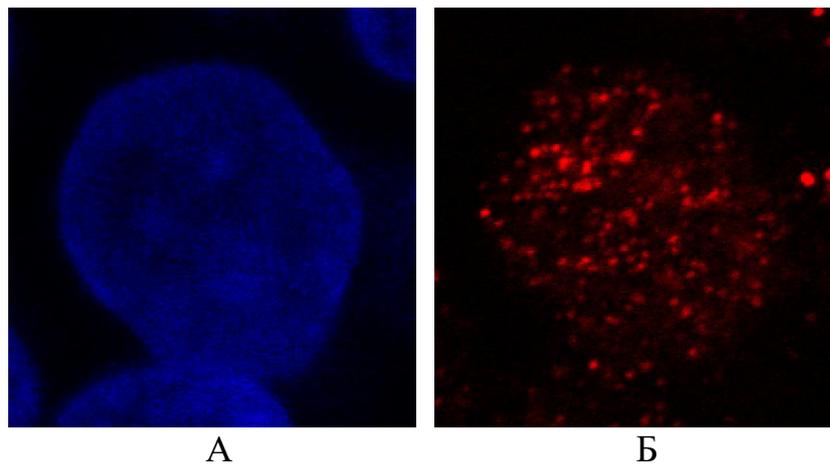


Рис. 2. Ядерна локалізація білка USP1 у клітинах K562. А – ядра клітин забарвлені ДНК-зв'язувальним барвником DAPI (синє). Б – локалізація USP1 (червоне). Імунофлуоресцентний аналіз, конфокальна мікроскопія, x100 [19]

Колокалізація USP1 з онкобілком Vcr-Abl у клітинах K562.

Особливий інтерес становить механізм формування та функціонування білкового комплексу USP1/Vcr-Abl у клітинах ХМЛ. Дослідження колокалізації USP1 та Vcr-Abl за допомогою імунофлуоресцентного аналізу з подальшою конфокальною мікроскопією (рис. 3) продемонструвало чітке перекриття сигналів локалізації цих білків у ядрі клітин K562. Кількісний аналіз за допомогою коефіцієнта кореляції Пірсона показав помірний рівень кореляції сигналів, тоді як коефіцієнт колокалізації Мандерса виявив високий ступінь перекриття сигналів локалізації цільових білків. Виявлена ядерна колокалізація білків USP1 і Vcr-Abl має важливе біологічне значення, дає розуміння про принципи просторового розподілу білків, участь у спільних сигнальних шляхах. Оскільки USP1 є деубіквітинуючим ферментом, його просторове співіснування з Vcr-Abl створює передумови для прямої або опосередкованої регуляції рівня онкобілка в клітинах ХМЛ. Деубіквітинування Vcr-Abl може перешкоджати його протеасомній деградації, сприяючи накопиченню та підтриманню проліферативного й антиапоптозного фенотипу клітин ХМЛ [20, 21].

Створення генетичних конструкцій pECFP-C3-USP1-domain-1, pECFP-C3-USP1-domain-2 та аналіз особливостей доменної організації білка USP1. Доменна організація USP1 є критично важливо для розуміння механізмів його участі в патогенезі ХМЛ. Ми вважаємо, що формування

білкового комплексу Vcr-Abl/USP1, призводить до порушення протеасомної деградації онкобілка, його накопичення та підтримання проліферативного й антиапоптотичного фенотипу клітин. Вивчення функціональних особливостей доменів USP1 відкриває нові можливості для розуміння механізмів формування білкового комплексу Vcr-Abl/USP1, протеасомної деградації Vcr-Abl у клітинах ХМЛ та терапії захворювання.

З метою вивчення механізмів формування білкового комплексу Vcr-Abl/USP1, було створено генетичні конструкції рЕСFP-C3-USP1-domain-1 та рЕСFP-C3-USP1-domain-2 наступним чином.

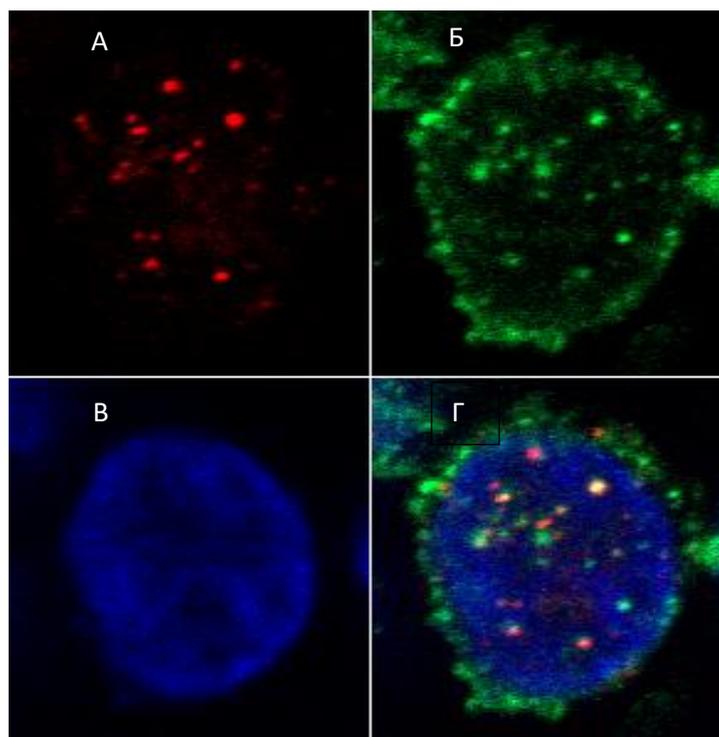


Рис. 3. Імунофлуоресцентний аналіз локалізації білка USP1 (А, червоне) і онкобілка Vcr-Abl (Б, зелене) у клітинах K562. Ядра дофарбовані барвником DAPI (В, синє). Перекриття сигналів локалізації (Г, жовте) [21]

За результатами ПЛР реакції були отримані цільові послідовності двох доменів гена USP1, з очікуваними для них розмірами. Розмір USP1-domain-1 становить 874 п.н., а USP1-domain-2 - 1251 п.н. За допомогою реакції лігування було створено генетичні конструкції рЕСFP-C3-USP1-domain-1 та рЕСFP-C3-USP1-domain-2 [11, 12].

Генетичні конструкції рЕСFP-C3-USP1-domain-1 та рЕСFP-C3-USP1-domain-2 були успішно ідентифіковані шляхом картування за відповідними сайтами рестрикції. Так, після розрізання виділених плазмід рЕСFP-C3-USP1-domain-1 та рЕСFP-C3-USP1-domain-2, які, містили вставки цільових генів, було виявлено фрагменти різних розмірів методом електрофоретичного розділення нуклеїнових кислот за стандартних умов. Для рЕСFP-C3-USP1-domain-1 ці фрагменти становили: 5 п.н., 215 п.н., 5381 п.н., а для рЕСFP-C3-USP1-domain-2 1081 п.н., 4897 п.н. (рис. 4). Правильність рамки зчитування підтверджено шляхом секвенування [11, 12].

Створені генетичні конструкції рЕСFP-C3-USP1-domain-1 та рЕСFP-C3-USP1-domain-2 забезпечують експресію відповідних доменів білка USP1, структурні характеристики яких були спрогнозовані на основі наявних літературних даних [22].

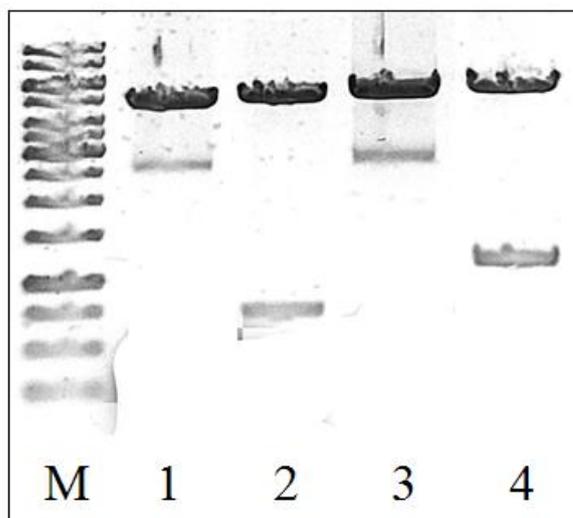


Рис. 4. Електрофореграма, скринінг цільових рекомбінантів: 1 – вектор рЕСFP-C3, результати рестрикційного картування за сайтами SalI, PstI; 2 – результати реакції лігування кодуючої послідовності домена 1 гена USP1 у плазмідний вектор рЕСFP-C3, результати рестрикційного картування рЕСFP-C3-USP1 за сайтами SalI, PstI; 3 - вектор рЕСFP-C3, результати рестрикційного картування за сайтами EcoRI; 4 – результати реакції лігування кодуючої послідовності домена 2 гена USP1 у плазмідний вектор рЕСFP-C3, результати рестрикційного картування рЕСFP-C3-USP1 за сайтами EcoRI. М – маркер молекулярних мас GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific) [12]

Генетична конструкція USP1-domain-1 кодує білок довжиною 294 амінокислотні залишки. Структурний аналіз домену (рис. 5) показав, що він містить два сайти ядерної локалізації (NLS), сигнал ядерного експорту (NES), вставку L1, деградуєчий мотив та ділянку взаємодії з UAF1 [11, 12, 22].

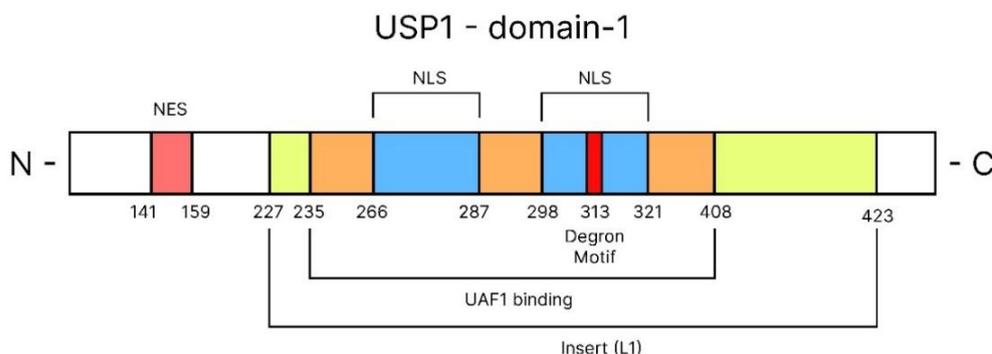


Рис. 5. Структурна будова домену білка USP1-domain-1. NES - сигнал ядерного експорту; NLS - сайти ядерної локалізації; Degron motif - деградуєчий мотив; UAF1 binding - ділянка, відповідальна за взаємодію з UAF1; Insert (L1)- вставка L1 [22]

Сайти ядерної локалізації (NLS) забезпечують транспортування білка в ядро, тоді як сигнал ядерного експорту (NES) відповідає за його

вихід у цитоплазму. Вставка L1 (L1 insert) є унікальною петлею в каталізаторно-подібному домені USP1 і бере участь у регуляції активності білка. Мотив деградації (Degradation Motif) визначає білок як субстрат для убіквітин-залежної деградації, а ділянка взаємодії з UAF1 (UAF1-interacting region) забезпечує зв'язування з регуляторним партнером, необхідним для активації USP1 [22].

Таким чином, аналіз структурних елементів USP1-domain-1 свідчить, що домен містить ключові компоненти, які визначають його субклітинну локалізацію, стабільність та здатність до регуляторних взаємодій.

Структурна будова домену білка USP1-domain-2 (рис. 6) закодована 379 амінокислотами, містить два сайти His-боксу (H593 і D751), сайт автокаталітичного розщеплення G670/G671, вставку L2 та ділянку взаємодії з UAF1 [11, 12, 22].

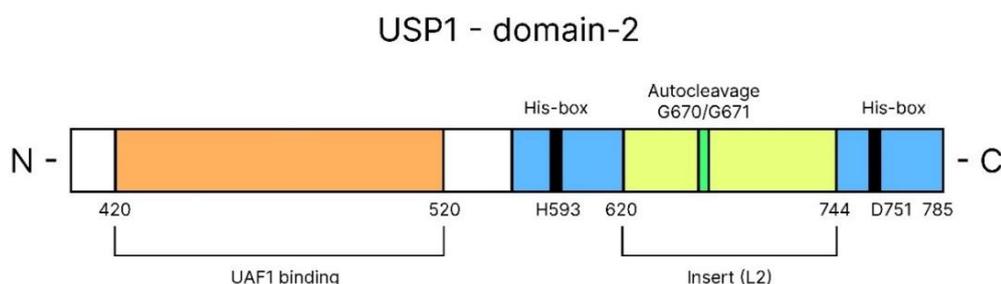


Рис. 6. Структурна будова домену білка USP1-domain-2. UAF1 binding - ділянка, відповідальна за взаємодію з UAF1; His-бокс (H593 і D751) - частина каталітичного центру His-боксу; Autocleavage G670/G671 - сайт автокаталітичного розщеплення; Insert (L2) - вставка L2 [22]

Сайти His-боксу (H593 і D751) формують каталітичне ядро білка і забезпечують гідроліз убіквітину, що визначає ферментативну активність USP1. Сайт автокаталітичного розщеплення (G670/G671) необхідний для правильного процесингу та функціонування білка. Вставка L2 (L2 insert) є регуляторною петлею, що модулює ферментативну активність домену. Ділянка взаємодії з UAF1 (UAF1-interacting region) забезпечує формування активного білкового комплексу USP1-UAF1 [11, 12, 22].

Отже, USP1-domain-2 включає ключові каталізаторно-функціональні елементи, які визначають його деубіквітиназну активність та здатність до взаємодії з регуляторними білковими партнерами, забезпечуючи виконання біологічних функцій білка.

Висновки. Таким чином, можна підвести підсумки, що у ході дослідження було систематизовано знання, щодо особливості субклітинної локалізації USP1 та колокалізації Src-Abl і USP1 у клітинах ХМЛ. Було створено та верифіковано рекомбінантні генетичні конструкції рЕСFP-C3-USP1-domain-1 та рЕСFP-C3-USP1-domain-2, що здатні забезпечити окрему експресію двох функціональних доменів білка USP1. Прогнозування їх структурної організації на основі літературних даних

дозволило визначити ключові регуляторні та каталізаторні елементи, що визначають локалізацію, стабільність та взаємодію доменів із партнерами білка USP1. Враховуючи роль USP1 у регуляції рівня онкопротеїну Bcr-Abl, отримані конструкції відкривають перспективи для подальших досліджень у клітинних моделях, спрямованих на вивчення молекулярних механізмів взаємодії USP1 з Bcr-Abl та визначення потенційних точок терапевтичного втручання. Аналіз доменної організації USP1 має принципове значення для з'ясування його каталітичної активності, субклітинної локалізації та механізмів формування комплексу Bcr-Abl/USP1, який, ймовірно, сприяє зниженню протеасомної деградації Bcr-Abl і накопиченню онкопротеїну, що веде до прогресування хвороби. Таким чином, поглиблене дослідження цих взаємодій формує підґрунтя для розробки нових стратегій регуляції рівня онкопротеїну та альтернативних терапевтичних підходів у лікуванні хронічної мієлоїдної лейкемії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Chereda B., Melo J.V. Natural course and biology of CML. *Annals of Hematology*. 2015; Vol.94, S2. P.107–121. doi: 10.1007/s00277-015-2325-z.
2. Jabbour E., Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2020 update on diagnosis, therapy and monitoring. *American Journal of Hematology*. 2020. Vol. 95, № 6. P. 691–709. doi:10.1002/ajh.25792.
3. Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukemia. *Nature Reviews Cancer*. 2005. Vol.5, № 3. P.172-183. DOI: 10.1038/nrc1567.
4. Antonenko S. V., Telegeev G. D. Inhibition of USP1, a new partner of BCR-ABL, results in decrease of BCR-ABL level in K562 cells. *Experimental Oncology*. 2020; Vol.42, № 2. P. 124–131 (опубл. у 2023). DOI: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-42-no-2.14533.
5. Антоненко С. В. ПОЛЬ USP1, GLG1, ZNF217 у розвитку та прогресуванні Bcr-Abl-позитивної хронічної мієлоїдної лейкемії: дис. канд. біол. наук: 03.00.22. Київ: ІМБіГ.
6. Liang X.-W., Wang S.-Z., Liu B. A review of deubiquitinases and thier roles in tumorigenesis and development. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2023. Vol. 11. doi:10.3389/fbioe.2023.1204472.
7. ATCC. K-562, Human Chronic Myelogenous Leukemia Cell Line (CCL-243). ATCC Product Sheet. URL: <https://www.atcc.org/products/ccl-243>
8. ATCC. HEK-293, Human Embryonic Kidney Cell Line (CRL-1573). ATCC Product Sheet. URL: <https://www.atcc.org/products/crl-1573>
9. ATCC. Animal Cell Culture Guide. American Type Culture Collection. URL: <https://www.atcc.org/resources/culture-guides/animal-cell-culture-guide>
10. Sigma-Aldrich. Pei transfection protocol hek293t. 938874-Protocol. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/127/213/938874-protocol-ww.pdf>
11. Matvieienko A.S., Antonenko S.V., Guryanov D.S., Telegeev G.D. Creation of genetic constructs pECFP-C3-USP1-domain-1 and pECFP-C3-USP1-domain-2 for analysis of the functional role of USP1 domains and their role in the formation of the USP1/Bcr-Abl protein complex in chronic myeloid leukemia cells. *Book of Abstracts of XIX All-Ukrainian Conference of Young Scientists. May 20–21, 2025, Kyiv, Ukraine*. P. 60.

12. Matvieienko A. S., Antonenko S. V., Guryanov D. S., G. D. Telegeev. Generation of recombinant constructs pECFP-C3-USP1-domain-1 and pECFP-C3-USP1-domain-2 as key tools for studying the domain organization of USP1 and its interaction with the oncoprotein Bcr-Abl. *Molecular genetics and genomics*. 2025. Vol 36, C.69-74. DOI: <https://doi.org/10.7124/FEE0.v36.1715>.
13. Vutukuru, M.R., Sharma, D.K., Chakraborty, I. et al. A rapid and high-yield method for nucleic acid extraction. *Scientific Reports*. 2025. Vol. 15, № 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-95226-0>.
14. Shi R., Lewis R.S., Panthee D.R. Filter paper-based spin column method for cost-efficient DNA or RNA purification. *PLoS One*. 2018 Vol. 13, № 12. P.e0203011. doi: 10.1371/journal.pone.0203011.
15. Thermo Fisher Scientific. Purification of Genomic DNA Using. PureLink Silica Columns. URL: https://www.thermofisher.com/ua/en/home/references/protocols/nucleic-acid-purification-and-analysis/dna-extraction-protocols/purification-of-genomic-dna.html?utm_source=chatgpt.com (дата звернення 12.10.25).
16. CaCl₂ Competent Cells. URL: <https://www.cmbe.engr.uga.edu/protocols/CaCl2%20Competent%20Cells.pdf> (дата звернення 12.10.25).
17. Akligoh H., Molloy J. Chemically Competent Cell Preparation [Calcium Chloride Method]. 2022. DOI:dx.doi.org/10.17504/protocols.io.261ge4k8dv47/v1.
18. Lezin G., Kosaka Y., H. et al. A One-Step Miniprep for the Isolation of Plasmid DNA and Lambda Phage Particles. *PLoS ONE*. 2011. Vol. 6, № 8. P.e23457. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023457>.
19. Antonenko S. V., Gurianov D. S., Telegeev G. D. Colocalization of USP1 and PH domain of Bcr-Abl oncoprotein in terms of cronic myeloid leukemia cell rearrangements. *Tsitol Genet*. 2016. Vol.50(4). PMID: 30480413.
20. Nishchenko D., Antonenko S. V., Gurianov D. S., Telegeev G. D. Features of USP1 expression and localization in different types of malignant neoplasms. *Faktori eksperimental noi evolucii organizmiv*. 2024. Vol.34. P.88-94. DOI:10.7124/FEE0.v34.1622.
21. Antonenko S. V., Telegeev G. D. Inhibition of USP1, a new partner of Bcr-Abl, results in decrease of Bcr-Abl level in K562 cells. *Experimental Oncology*. 2020. Vol. 42, № 2. DOI:<https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-42-no-2.14533>.
22. Antonenko S., Zavelevich M., Telegeev G. The role of USP1 deubiquitinase in the pathogenesis and therapy of cancer. *Acta Biochimica Polonica*. 2023. Vol. 70, №2. P. 219-231. https://doi.org/10.18388/abp.2020_6636.

ЗМІСТ

| | Стор. |
|--|------------|
| РОЗДІЛ 1. БІТЕХНОЛОГІЯ | 4 |
| 1.1 Artificial intelligence empowers the development of materials in new pharmaceutical engineering: screening and application of polymer nanoparticles | 5 |
| Jia Wei, Ihor Hretskyi | |
| 1.2 Ecologically oriented microbial biotechnologies in the restoration of aquatic ecosystems and sustainable development of aquaculture after hostilities | 16 |
| Skrotskyi S. O., Khomenko L. A., Vasyliuk O. M. | |
| 1.3 Prospects for the use of <i>Pleurotus ostreatus</i> extract in tablet form for the prevention of atherosclerosis | 23 |
| Mykhailova K. I., Koziko N. O. | |
| 1.4 Протеїнази морських безхребетних антарктичного регіону як об'єкти медичної біотехнології | 29 |
| Нікітіна Н. С., Степанова Л. І., Ракша Н. Г., Вовк Т. Б., Галенова Т. І., Берегова Т. В., Савчук О. М. | |
| 1.5 Біозахист текстильних постільних виробів з об'ємними наповнювачами | 65 |
| Михайлова Г. М., Осієвська В. В. | |
| 1.6 Рослинні метаболіти флавоноїдної природи як індуктори синтезу фітогормонів ризобіями сої | 89 |
| Леонова Н. О., Фоменко С. В. | |
| 1.7 Особливості виробництва та застосування клітинних стінок <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 99 |
| Курило О. П., Губрій З. В., Красовська О. С., Булботка Н. В., Чепіга Т. В. | |
| 1.8 Біотехнологічні стратегії запобігання контамінації пивоварного процесу: причини та наслідки мікробіологічного псування пива | 109 |
| Лич І., Лич О., Бабченко В. | |
| 1.9 Антибактеріальні властивості комплексу високомолекулярних білків козиного молозива | 117 |
| Лич І., Єгорова К., Волошина І. | |
| 1.10 Дослідження впливу вегетативних добавок на біометаногенез | 124 |
| Маріїн Д. В., Сакалова Г. В. | |
| 1.11 Одержання екстрактів калусної біомаси амаранту для косметичних засобів | 132 |
| Гуцько К. І., Петріна Р. О. | |

| | | |
|-------------|--|------------|
| 1.12 | Калусна біомаса <i>Arnica montana</i> як альтернатива природній фітосировині | 140 |
| | Домашовець А. О., Петріна Р. О. | |
| 1.13 | Використання носіїв для підвищення ефективності біологічного очищення стічних вод | 146 |
| | Жукова В.С., Саблій Л. А. | |
| 1.14 | Порівняння рухомих і нерухомих носіїв біоплівки різних конструкцій для очищення стічних вод | 151 |
| | Гриневич А.О., Саблій Л.А. | |
| 1.15 | Використання липкогенних композицій на основі препарату ЕПАА – М при розробці біопрепаратів для рослинництва | 156 |
| | Кирилов В. О., Юр'єва О. М., Савчук Я. І., Данкевич Л. А., Леонова Н. О. | |
| 1.16 | Оцінка функціонального потенціалу екзополісахаридів антарктичних екстремофілів екстрагованих різними методами | 162 |
| | Юнгін О. С., Калініченко О. О., Морін В. В., Резнік Д. І., Охмат О. А. | |
| 1.17 | Вплив наносрібла на біосинтез молочної кислоти | 167 |
| | Гусейнова К. Е., Петрух А. О., Золотар О. С., Шкотова Л. В., Волошина І. М | |
| 1.18 | Біосинтез бактеріальної целюлози на середовищі з льоном | 173 |
| | Косинська Т. В., Потупа В. Ю., Федько М. М., Жеревчук С. М., Волошина І. М. | |
| 1.19 | Вплив температури та рН на біосинтез екзополісахаридів <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 180 |
| | Юркевич А. І., Майстренко Л.А., Шкотова Л. В., Волошина І. М. | |
| 1.20 | Сучасні підходи до аналізу субстанцій біологічних/біотехнологічних лікарських засобів з використанням методу ВЕРХ | 186 |
| | Вельчинська О. В., Ніженковська І. В., Мелешко Р. А. | |
| 1.21 | Математичне моделювання процесу екстрагування цільових компонентів з біомаси дріжджів | 187 |
| | Волошкевич П. П., Пукач П. Я., Корендій В. М., Гриценко О. М., Кунинець А. В. | |
| 1.22 | Оцінка біотехнологічного потенціалу екстремофілів: від скринінгу пга до методів їх екстракції | 201 |
| | Калініченко О. О., Юнгін О. С. | |
| 1.23 | Особливості процесів відмивки бактеріальних клітин та тілець включення в рекомбінатних біотехнологіях | 214 |
| | Хейломський Д. О., Майстренко Л. А., Мокроусова О. Р. | |

| | |
|---|------------|
| 1.24 Виробництво та застосування морського колагену у фармації | 222 |
| Січевлюк А. В., Мокроусова О. Р. | |
| 1.25 Бактеріальні екзополісахариди як об'єкт біотехнології | 226 |
| Цуканов І. С., Колесник Т. О., Калініченко О. О., Охмат О. А. | |
| 1.26 Міжнародний день ДНК з українським акцентом: досвід науково-освітньої та виховної роботи | 233 |
| Щербатюк Т. Г., Букорос Т. О., Мокроусова О. Р. | |
| 1.27 Наночастки та потенціал застосування їх антимікробних властивостей | 244 |
| Писаренко П. О., Охмат О. А. | |
| 1.28 Вірусологія в біотехнології: Фундамент, інструменти та інновації | 269 |
| Жолобак Н. М. | |
| 1.29 Оцінка впливу електромагнітного випромінювання на біосинтез молочної кислоти молочнокислими бактеріями ... | 281 |
| Волошина І. М., Кужель А. А., Грецький І. О. | |
| 1.30 Очищення стічних вод із застосуванням сірко-окиснювальних бактерій | 289 |
| Савицька К. В., Давидюк Д. А. | |
| 1.31 Білок USP1: Субклітинна локалізація, доменна структура та функціональні аспекти участі в патогенезі хронічної мієлоїдної лейкемії | 293 |
| Матвеєнко А. С., Антоненко С. В., Гур'янов Д. С., Телегєєв Г. Д. | |

ПЕРЕЛІК АВТОРІВ

| | | | |
|-------------------|--------------------------------|--------------------|----------------------|
| Hretskyi Ihor | 5, 281 | Леонова Н. О. | 89, 156 |
| Khomenko L. A. | 16 | Лич І. | 109, 117 |
| Koziko N. O. | 23 | Лич О. | 109 |
| Mukhailova K. I. | 23 | Майстренко Л. А. | 180, 214 |
| Skrotskyi S. O. | 16 | Маріїн Д. В. | 124 |
| Vasyliuk O. M. | 16 | Матвєєнко А. С. | 293 |
| Wei Jia | 5 | Мелешко Р. А. | 186 |
| Антоненко С. В. | 293 | Михайлова Г. М. | 65 |
| Бабченко В. | 109 | Мокроусова О. Р. | 214, 222, 233 |
| Берегова Т. В. | 29 | Морін В. В. | 162 |
| Букорос Т. О. | 233 | Ніженковська І. В. | 186 |
| Булботка Н. В. | 99 | Нікітіна Н. С. | 29 |
| Вельчинська О. В. | 186 | Осієвська В. В. | 65 |
| Вовк Т. Б. | 29 | Охмат О. А. | 162, 226, 244 |
| Волошина І. М. | 117, 167, 173, 180, 281 | Петріна Р. О. | 132, 140 |
| Волошкевич П. П. | 191 | Петрух А. О. | 173 |
| Галенова Т. І. | 29 | Писаренко П. О. | 244 |
| Гриневич А. О. | 151 | Потупа В. Ю. | 173 |
| Гриценко О. М. | 191 | Пукач П. Я. | 191 |
| Губрій З. В. | 99 | Ракша Н. Г. | 29 |
| Гур'янов Д. С. | 293 | Резнік Д. І. | 162 |
| Гусейнова К. Е. | 167 | Саблій Л. А. | 146, 151 |
| Гуцько К. І. | 132 | Савицька К. В. | 289 |
| Давидюк Д. А. | 289 | Савчук О. М. | 29 |
| Данкевич Л. А. | 156 | Савчук Я. І. | 156 |
| Домашовець А. О. | 140 | Сакалова Г. В. | 124 |
| Єгорова К. | 117 | Січевлюк А. В. | 222 |
| Жеревчук С. М. | 173 | Степанова Л. І. | 29 |
| Жолобак Н. М. | 269 | Телегєєв Г. Д. | 293 |
| Жукова В. С. | 146 | Федько М. М. | 173 |
| Золотар О. С. | 167 | Фоменко С. В. | 89 |
| Калініченко О. О. | 162, 201, 226 | Хейломський Д. О. | 214 |
| Кирилов В. О. | 156 | Цуканов І. С. | 226 |
| Колесник Т. О. | 226 | Чепіга Т. В. | 99 |
| Корендій В. М. | 191 | Шкотова Л. В. | 167, 180 |
| Косинська Т. В. | 173 | Щербатюк Т. Г. | 233 |
| Красовська О. С. | 99 | Юнгін О. С. | 162, 201 |
| Кужель А. А. | 281 | Юр'єва О. М. | 156 |
| Кунинець А. В. | 191 | Юркевич А. І. | 180 |
| Курило О. П. | 99 | | |

Наукове видання

**ІННОВАЦІЙНІ МАТЕРІАЛИ ТА ТЕХНОЛОГІЇ:
БІОТЕХНОЛОГІЯ, ПРИКЛАДНА ХІМІЯ,
ЕКОЛОГІЯ**

ТОМ I

Монографія

*За загальною редакцією
д-ра техн. наук, проф. О. Р. Мокроусової,
д-ра техн. наук, проф. В. П. Плаван*

Відповідальний за поліграфічне виконання *Л. Л. Овечкіна*

Підп. до друку 23.12.2025 р. Формат 60x84 1/16.
Ум. друк. арк. 17,90. Облік. вид. арк. 14,01. Наклад 300 пр. Зам. 2270.

Видавець і виготовлювач Київський національний університет технологій та дизайну,
вул. Мала Шияновська 2, м. Київ-11, 01011.

Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи до державного реєстру видавців,
виготовників і розповсюджувачів видавничої продукції ДК № 993 від 24.07.2002.