ПЕРСПЕКТИВНІ МАТЕРІАЛИ ТА ІННОВАЦІЙНІ ТЕХНОЛОГІЇ: БІОТЕХНОЛОГІЯ, ПРИКЛАДНА ХІМІЯ ТА ЕКОЛОГІЯ

Колективна монографія

Київ
«Світ Успіху»
2020

УДК 60+54+675.6.01](02)
П27

Рекомендовано до видання
Вченою радою Київського національного університету
технологій та дизайну МОН України
Протокол № 7 від 29.05.2020 р.

Рецензенти:

Чумак Віталій Лукич — доктор хімічних наук, професор, завідувач кафедри хімії і хімічної технології Національного авіаційного університету.

Кузьмінський Євген Васильович — доктор хімічних наук, професор, завідувач кафедри екобіотехнології та біоенергетики Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського».

П27 Перспективні матеріали та інноваційні технології: біотехнологія, прикладна хімія та екологія : колективна монографія / за заг. ред. О. Р. Мокроусової. Київ : Світ Успіху, 2020. 492 с.

ISBN 978-617-7324-38-5

Колективна монографія відображає результати актуальних наукових досліджень, розроблень, апробацій та практичного застосування у галузі біотехнології, хімічної технології шкіри та хутра, екології та товарознавства шкіряно-хутрової продукції.

Розглянуто питання розроблення та створення нових речовин та матеріалів для хімічних і біотехнологій, удосконалення процесів перероблення сировини біогенного походження, започаткування принципів раціонального природокористування та ресурсозбереження у технологіях виробництва шкіри та хутра, екологічних аспектів виробництва різнофункціональних матеріалів, удосконалення методів очищення промислових стоків, розширення асортименту та підвищення якості натуральних і синтетичних шкір.

Колективна монографія рекомендується для студентів, аспірантів, дослідників, науковців та експертів, що спеціалізуються у галузі біотехнології, хімічної технології та екології.

ISBN 978-617-7324-38-5

© КНУТД, 2020
© Світ Успіху, 2020

Recommended for publication
by the Academic Council of Kyiv National University
of Technologies and Design of Ministry
of Education and Science of Ukraine
Protocol № 7 dated May 29 2020.

Reviewers:

Chumak Vitaly Lukich — Doctor of Chemistry, Professor, Head of the Department of Chemistry and Chemical Technology of National Aviation University

Kuzminskiy Yevgeniy Vasylyovych — Doctor of Chemistry, Professor, Head of the Department of Ecobiotechnology and Bioenergy of National Technical University of Ukraine «Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute»

Advanced materials and innovative technologies: Biotechnology, Applied Chemistry and Ecology : collective monograph / edited by Olena Mokrousova. Kyiv : Svit Uspichu, 2020. 492 p.

ISBN 978-617-7324-38-5

The collective monograph summarizes the results of current scientific research, development, testing and application in the fields of biotechnology, chemical technology of leather and fur, ecology and commodity science of leather and fur products. It is discussed the issues of development of new substances and materials for chemical and biotechnologies as well as improvement of biogenic raw materials processing along with the principles of rational environmental management and resource conservation in leather and fur technologies. Moreover, the ecological aspects of production of various functional materials, improvement of industrial wastewater treatment methods, expansion range and increasing the quality of natural and synthetic leathers were also considered.

Collective monograph is recommended for undergraduates and graduated students, researchers, scientists and experts in biotechnology, chemical technology and ecology.

ЗМІСТ

ВСТУП **8**

РОЗДІЛ 1. БІОТЕХНОЛОГІЯ **21**

1.1 Розробка біотехнологічних продуктів на основі відходів колагенвмісної сировини **22**
Ціла О. О., Ракша Н. Г., Галенова Т. І., Вовк Т. Б., Савчук О. М., Мокроусова О. Р., Остапченко Л. І.

1.2 Alkaline and enzymatic keratin hydrolysates obtained from sheep wool **37**
Mariana Daniela Berechet, Carmen Gaidau, Maria Stanca, Demetra Simion, Cosmin Alexe, Dana Gurau, Maria Râpă, Marius Becheritu

1.3 The influence of surfactants in the context of novel biotechnologies, for elastin membrane preparation **54**
Demetra Simion, Carmen Gaidau, Gabriela Paun, Daniela Berechet, Olga Niculescu, Maria Stanca

1.4 К вопросу о возможности использования краевой обрези лап северного оленя для получения белкового гидролизата ... **63**
Шалбуев Дм. В., Раднаева В. Д., Советкин Н. В.

1.5 Отримання продуцента рекомбінантного фактора росту ендотелію судин **74**
Окунєв О. В., Горбатюк О. Б., Похоленко Я. О., Іродов Д. М., Кордюм В. А.

1.6 Біоактивні пептиди молозива як складові компоненти потенційного поліфункціонального парафармацевтика **80**
Лич І. В., Моцар А., Волошина І. М.

1.7 Регуляція клітинного циклу GC-1 spg I GC-2 spd **105**
Шемедюк Н. П.

1.8 Тіосульфонати: шляхи їх синтезу та перспективи застосування.....116
Монька Н. Я., Василюк С. В., Баранович Д. Б., Стадницька Н. Є., Паращин Ж. Д., Хоміцька Г. М., Шиян Г. Б., Комаровська-Порохнявець О. З., Гавриляк В. В., Швед О. В., Мартиросян І. А., Бочарова О. В., Новіков В. П., Лубенець В. І.

1.9 Біотехнологія калусної біомаси як метод збереження біорізноманіття лікарських рослин.....137
Петріна Р. О., Загородня Д. С., Ільків Б.-В. В., Суберляк С. А., Князєва К. С., Гавриляк В. В.

1.10 Нанокосметика: плюси та мінуси 146
Гавриляк В. В., Федорова О. В., Петріна Р. О.

1.11 Бактериоцины, синтезируемые *Lactobacillus* 158
Волошина И. Н., Красинько В. О., Бойко Т. О., Лыч И. В., Шкотова Л. В.

1.12 Основні ресурси хітину і хітозану грибного походження...178
Нікітіна О. О., Нікіфорова Д. О.

1.13 Біолюмінесцентне тестування та особливості тест-систем на основі люмінесцентних бактерій 188
Кондратюк О. О., Сидоренко Д. В., Грецький І. О.

1.14 Сучасні біотехнологічні методи отримання колагену....198
Шидловська О. А.

1.15 Особливості виділення колагену біомедичного призначення зі шкур ссавців 212
Майстренко Л. А.

1.16 Особливості функціонування колагену в процесі загоєння ран 224
Юнгін О. С.

1.17 Біотехнологічні аспекти розробки вірусних вакцинних препаратів 232
Жолобак Н. М.

РОЗДІЛ 2. ПРИКЛАДНА ХІМІЯ 243

2.1 Articles made of sheep fur with therapeutic properties 244
Olga Niculescu, Carmen Gaidau, Demetra Simion, Mariana Daniela Berechet, Dana Gurau

2.2 Бесхромовое дубление в присутствии солей цинка.....254
Чурсин В. И.

2.3 О возможности укрепления кожевой ткани пушно-мехового сырья соединениями олигомерного характера 264
Островская А. В., Латфуллин И. И., Шагивалиева Р. Р., Щелокова В. С.

2.4 Исследование влияния анионного ПАВ на подготовительные процессы обработки шкурок кролика 275
Лутфуллина Г. Г., Петрова С. А., Хайрутдинова Р. И.

2.5 Обработка меха высокочастотной плазмой пониженного давления.....282
Баллыев С. Б., Шарифуллин Ф. С., Вознесенский Э. Ф.

2.6 Оценка смачивающей способности композиций ПАВ.....289
Лутфуллина Г. Г., Хайрутдинова Р. И., Петрова С. А.

2.7 Исследование влияния плазменной модификации на гигиенические свойства кожи из шкур камбалы 296
Шорохов А. А., Тихонова В. П., Рахматуллина Г. Р., Туканова С. Х., Осетрова И. А.

2.8 Підвищення ефективності рідинного оздоблення велюру шляхом застосування модифікованих дисперсій монтморилоніту.....305
Охмат О. А., Бондарєва А. О., Мокроусова О. Р.

2.9 Застосування модифікованих дисперсій монтморилоніту у хромзбережному дубленні шкір 314
Жалдак М. П., Мокроусова О. Р.

2.10 Екологічно орієнтована технологія виготовлення гідрофобізованого хутрового велюру 334
Данилкович А. Г., Романюк О. О., Ліщук В. І.

2.11 Вплив старіння на властивості шкір, виготовлених із використанням полімерних матеріалів на основі ненасичених карбонових кислот під час рідинного оздоблення 352
Майстренко Л. А., Андреєва О. А., Мережко Н. В.

РОЗДІЛ 3. ЕКОЛОГІЯ ТА ТОВАРОЗНАВСТВО ШКІРИ І ХУТРА ..371

3.1 Технологія очищення стічних вод фармацевтичних підприємств від антибіотиків.....372
Саблій Л. А., Жукова В. С.

3.2 Біологічне очищення висококонцентрованих стічних вод шкіряного виробництва 384
Ребрикова П. А., Мокроусова О. Р.

3.3 Вдосконалення методів очищення стічних вод від іонів хрому 393
Сакалова Г. В., Василінич Т. М., Петрук Г. Д.

3.4 Товарознавча експертиза півпальто з хутряного велюру, що перебувало в експлуатації.....407
Омельченко Н. В., Браїлко А. С., Лисенко Н. В.

3.5 Модифіковані волокнисто-сітчасті матеріали типу «шкіркартон» на основі колагену та целюлози.....422
Фордзюн Ю. І., Андреєва О. А.

3.6 Дослідження пластичності та формостійкості шкір, виготовлених за різних умов рідинного оздоблення.....432
Первая Н. В., Андреєва О. А.

3.7 Стан ринку дитячого взуття та натуральних шкір для його виготовлення.....441
Жалдак М. П., Мокроусова О. Р.

3.8 Екошкіра: фейки та реальність.....459
Касьян Е. Є.

1.14 СУЧАСНІ БІОТЕХНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ОТРИМАННЯ КОЛАГЕНУ

Шидловська О. А.

Київський національний університет технологій та дизайну, Україна
shydlovska.oa@knutd.edu.ua

Біомедичне застосування колагену вимагає пошуку ефективних методів синтезу білка, що володіє визначеними фізико-хімічними та біологічними характеристиками. Найефективнішими системами експресії рекомбінантного колагену є рекомбінантні штами Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris, Escherichia coli та Streptococcus pyogenes, а також трангенні рослини тютюну та кукурудзи. Перераховані генно-інженерні організми забезпечують високий вихід рекомбінантного колагену, що має правильну трьох-спіральну структуру та високу ефективність застосування в різних галузях.

Ключові слова: *колаген, біотехнологія, мікробний синтез, дріжджі, трансгенні рослини, тварини*

Колаген — фібрилярний білок, найпоширеніший в організмі людини. Його частка становить 25–33 % від усього білка, тобто приблизно 6 % маси тіла. Молекула колагену має довжину близько 300 нм та молекулярну масу 300 кДа. Сама молекула складається із трьох поліпептидних ланцюгів, що мають вигляд ліво закрученої спіралі [1]. Існує близько 12 типів колагенів, що різняться між собою первинною структурою, вмістом вуглеводів та тканинною локалізацією. Так, колаген I типу локалізується у шкірі, кістках, сухожиллях, рогівці ока та склері. У хрящах та склоподібному тілі міститься колаген II типу. Локалізація колагену III типу — шкіра плода, стінки великих кровоносних судин, регуляторні волокна [2].

При певних порушеннях метаболічної та ферментативної активності білків організму можливе розщеплення колагену специфічними колагеназами та гідроліз його тканинними протеїназами до амінокислот. Підвищений розпад колагену в організмі можна визначити за високою концентрацією оксипроліну в сечі.

Надмірне руйнування молекул колагену (вище нормальних показників) може спостерігатися при деяких ураженнях сполучної тканини, суглобів і кісток, синдрому діабетичної стопи [2].

Роль колагену в шкірі полягає у забезпеченні міцності на розрив та еластичності. Зі збільшенням віку шкіра вкривається зморшками і стає в'ялою, що зумовлено зниженим синтезом білку. Процес зниження інтенсивності синтезу колагену корелює зі старінням фібробластів і втратою механічних властивостей колагену. Екзогенні фактори, зокрема куріння, стрес та прийом стероїдів, також можуть впливати на рівень колагену [3].

Отже, колаген має важливе значення у таких галузях, як фармацевтика, біологія, медицина, косметологія, а тому питання промислового отримання якісного продукту з визначеними характеристиками є принципово вагомим. Саме тому метою даного огляду є аналіз сучасних та ефективних методів отримання колагену. Об'єктом дослідження є властивості колагену різного походження, а предметом — технології синтезу колагеноподібних білків.

Колаген тваринного походження. Промислово отриманий колаген має тваринне джерело походження, наприклад колаген великої рогатої худоби та колаген курки. Також колаген можна отримати від людини, але лише через донорів. Колаген, що отримують із відходів гідролізованого вапна великої рогатої худоби або методом із застосуванням пепсину, має однакову структуру потрійної спіралі та механічні властивості нативного колагену. Виробництво колагену тваринного походження повинно відповідати суворим технологічним процесам, має проходити контроль якості. Екстрагований колагеновий продукт повинен бути чистим, не містити будь-яких вірусних або пріонних часток, а також мати однакові механічні властивості з нативним колагеном [4].

Оскільки сполучна тканина є найважливішим компонентом м'яса і м'ясопродуктів, одним із найпоширеніших джерел колагену також є колагеновмісна сировина, яку отримують із м'ясного виробництва. Використання даної сировини без попередньої обробки пов'язано з певними труднощами, зокрема з низькою біологічною активністю. Серед ефективних методів

отримання колагену з м'ясної сировини є ферментативний гідроліз. Його особливістю, на відміну від хімічних способів, є проведення процесу при температурі 35–50 °С. При цьому не відбувається руйнування амінокислот і їх рацемізації. Протеолітичні ферменти, які застосовують у ферментативному гідролізі мають бактеріальне походження і становлять приблизно половину виробництва всіх ферментних препаратів на світовому ринку. Серед використовуваних ефективних ферментних препаратів можна виділити протосубтилін Г10Х (продуцент *Bacillus subtilis*), мегатерин Г10Х (продуцент *Bacillus megaterium*). Ферментні препарати мають підвищену протеолітичну активність у сировині, що містить сполучну тканину [5].

Отримання колагену зі стерильного хряща курки із застосуванням оброблення ультразвуком забезпечує вихід білку колагену II типу з підвищеним умістом амінокислот. Для такого колагену характерні термічна стабільність, більш пориста структура, кращі фізико-хімічні та функціональні властивості. Проте отримання колагену з курячих хрящів не користується широким застосуванням, оскільки вихід білку є невисоким при значних затратах на процес екстракції колагену [6].

Колаген тваринного походження на сьогодні є розповсюдженим у промисловості, оскільки значну його частину використовують також і в харчовій промисловості. Для більш ефективного виділення чистого колагену з сировини тваринного походження застосовують методи оброблення ультразвуком та застосування ферментних препаратів мікробного походження. Однак для біомедичного застосування колагени тваринного походження є незручними, оскільки немає можливості отримувати визначені структури для застосування у різних галузях.

Колаген, отриманий з морських біооб'єктів. Альтернативним джерелом отримання колагенів є морські біологічні об'єкти. Так, розроблено технологію отримання колагенової губки з риби виду *Arothron stellatus*, просоченої антибактеріальним препаратом ципрофлоксацином. Технологія отримання колагенової губки полягає в поетапному висушуванні. Отримані губчасті колагенові структури продемонстрували

високоорганізовану структуру, володіють високою біосумісністю, що сприяє клітинній адгезії та прикріпленню клітин ліній ембріональних фібробластів миші NIH/3T3, так і клітин спонтанно трансформованої анеуплоїдної лінії імморталізованих кератиноцитів зі шкіри дорослої людини HaCaT. Колагенова губка гарно набухає для поглинання ексудатів, що покращує її механічні властивості *in vivo*. Показано, що просочена ципрофлоксаном губчаста колагенова структура має антибактеріальну активність. Також розроблений колагеновий препарат володіє ранозагоювальними властивостями, індукує ранній синтез колагену та експресію факторів росту протягом першого дня загоєння. Повна реепітеліалізація настає після 14-го дня. Застосування подібних колагенових губчастих каркасів має значну перспективу у застосуванні як ранозагоювальний матеріал [7].

Нативний колаген, отриманий з медузи ропилеми *Rhopilema Asamushi,* характеризується слабкою розчинністю у водних і сольових розчинах, та являє собою гомогенну білкову фракцію з молекулярною масою 220 кДа. Оброблення синтезованого колагену ультразвуком не впливає на розчинність колагену, проте забезпечує утворення низькомолекулярних компонентів, здатних агрегувати між собою. Кількість подібних агрегатів збільшується при застосуванні денатуруючи агентів. Найбільший вихід низькомолекулярних розчинених колагеноподібних білків утворюється при ферментативному гідролізі (74,2 % водорозчинного білка). Однак частково зберігається фракція, яка відповідає за молекулярною масою вихідному нативному білку. Отримані результати дають змогу зробити висновок щодо можливостей застосування отриманих фракцій колагену різними способами. Добре розчинні фракції колагену можуть бути використані в косметології у складі різних кремів та гелів, а слаборозчинні фракції — при виробництві волокон, плівок, губок, порошків, що володіють властивостями водо- та газонепроникності та мають високу сорбційну активність відносно біологічно активних речовин, що може забезпечити їх пролонговане вивільнення. Перераховані властивості мають вагоме значення при лікуванні інфікованих ран та опіків,

а також у косметології завдяки високому ступеню сумісності з фібробластами людини і відсутності алергічних реакцій [8].

Морські біооб'єкти є недооціненим джерелом отримання колагеноподібних білків. Морська біотехнологія є джерелом речовин із різними біологічними, фізичними, хімічними властивостями, що забезпечує цікавість до них як джерела нових ефективних біологічно-активних речовин. Колаген, отриманий з морських біооб'єктів, може знайти застосування як у медичній та біофармацевтичній галузях, так і в косметології.

Колаген, отриманий методом синтезу із дріжджових клітин. Колаген з *Pichia pastoris*. Альтернативою дорогого виробництва колагену з тваринного джерела є технологія бродіння. Як рекомбінантні організми для отримання людського колагену, желатину та гідроксильованого колагену використовують дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha* та бактерії *Escherichia coli* та *Bacillus brevis*. Застосування генно-інженерних мікроорганізмів — це економічно вигідна масштабна технологія отримання рекомбінантного людського колагену та рекомбінантного желатину. *P. pastoris* є найефективнішою з перерахованих моделлю для продукції рекомбінантного колагену та желатину. Клітини мікроорганізму здатні накопичувати рекомбінантний колаген у концентрації від 1 до 1,5 г/л, а рекомбінантний желатин — від 3 до 14 г/л. Особливістю використання *P. pastoris* для синтезу рекомбінантного колагену є те, що дана технологія забезпечує правильну внутрішньоклітинну збірку потрійних спіралей білку та секрецію неушкоджених його фрагментів. У цій генно-інженерній технології застосовують коекспресію колагену з ферментом проліл 4-гідроксилазою, що забезпечує пострансляційну модифікацію для отримання необхідної структури та стабільності. Описаний метод дозволяє отримувати фрагменти колагенового білка із визначеною молекулярною масою, складом та фізико-хімічними властивостями [9].

Отже, технологія синтезу колагену на *P. pastoris* є високоефективною, а отриманий колаген володіє стабільністю, біологічною активністю, а також може бути синтезований

з визначеною молекулярною масою, хімічними та фізичними властивостями, а також складом амінокислот.

Колаген з *Saccharomyces cerevisiae*. Існує багато технологічних розробок отримання рекомбінантного колагену на основі *S. cerevisiae*. Одним із прикладів таких розробок може бути експресійна система, що містить людську проліл-4-гідроксилазу для отримання колагену типу III [10]. За допомогою цієї системи можна отримати колаген із вмістом гідроксильованого проліну лише в кількості 0,5 %, що є низьким показником порівняно з природними рівнями гідроксилювання у колагені людини. Більшість робіт з розроблення технологій синтезу колагену на *S. cerevisiae* зосереджуються на досягненні нативного рівня гідроксилювання проліну, хоча, як розглянуто вище в огляді на прикладі інших організмів як експресійних систем, N- та С-пропептидні ділянки не є важливими та необхідними для формування потрійної спіральної конформації білку колагену. Навпаки, зменшення молекулярної маси забезпечує більший вихід продукту. З цього можна зробити висновок, що для покращення ефективності застосування *S. cerevisiae* як експресійної системи для колагену можна використати методи рекомбінантної інженерії та хімічних модифікацій [11].

Так, була розроблена модульна стратегія експресії колагену людини III типу на моделі *S. cerevisiae*, особливістю якої є уточнення кількості залишків гідроксипроліну до рівня нативного колагену. Вставки гідроксипроліну отримані з вставлених генів проліл-4-гідроксилази людини. Розроблена технологія забезпечує більший вихід білка колагену правильної конформації [12].

Ще одним методом, що дозволяє регулювати структуру синтезованого на *S. cerevisiae* колагену є застосування в рекомбінантній технології інтегрину. Ця модульна стратегія експресії забезпечує повнорозмірний синтез колагену людини III типу, використовуючи 12 фрагментів для формування домену потрійної спіралі. Гени α і β для людської проліл-4-гідроксилази були включені для каталізації утворення гідроксипроліну. Отриманий рекомбінантний колаген III типу мав стабільну трьох спіральну структуру, яка на високому рівні підтримувала адгезію клітин

ссавців. Додатково проведено дослідження ефективності адгезії та встановлення основних сайтів адгезії. Так, було проведено видалення п'яти відомих сайтів зв'язування інтегрину типу III (GROGER, GAOGER, GLOGEN, GLKGEN та GMOGER). Це призвело до порушення адгезії клітин ссавців. Після видалення вихідних сайтів адгезії було проведено модифікацію інтегринового фрагменту шляхом зв'язуючої послідовності типу I GFOGER, що ефективно відновило адгезію. Зокрема, було встановлено, що сила адгезії залежить не лише від кількості введених GFOGER, а ще й від їх розташуванні в молекулі інтегрину. Потенціал для створення сайтів адгезії інтегрину в різних типах людського колагену дає можливість вивчити принципи взаємодії клітин, а також генерувати цільові біоматеріали [11].

Розроблення експресійних систем для синтезу рекомбінантного колагену на моделі *S. cerevisiae* дозволяє отримувати високий вихід біологічно-активного білка, що має правильну трьохспіральну конформацію. Особливістю модифікаційних технологій є застосування білка інтегрину, що забезпечує високу адгезію клітин ссавців. Дана технологія має вагоме значення для розроблення колагеновмісних препаратів для лікування та загоєння ран різної етіології.

Колаген, отриманий методом синтезу із бактеріальних клітин. Колаген зі *Streptococcus pyogenes*. Рекомбінантний колаген також можна отримувати за допомогою *Streptococcus pyogenes*. Немодифікований колаген, отриманий з *S. Pyogenes*, демонструє низьку взаємодію з клітинами ссавців. Однак за допомогою рекомбінантних методів у поєднанні з хімічними можна отримати функціональний білок. Серед хімічних підходів можна виділити метод зшивання фрагментів колагенових білків для виготовлення стабільних рекомбінантних губчастих структур. Іншим практичним підходом може бути включення у структуру пептидів, які містять D-амінокислоти або інші некодовані амінокислоти, функціональні пептиди, які є циклічними або розгалуженими, а також цілу низку непептидильних лігандів, зокрема цукрів, ліпідів тощо, комплексні ліганди. Для рекомбінантного колагену з *S. pyogenes* продемонстровано декілька ефективних хімічних

модифікацій, що покращують якість цільового продукту. Так, проведено аналіз ефективності хімічної модифікації колагену із застосуванням похідних малеїміду, бромоацетилу та вінілсульфону. Ці стратегії модифікації забезпечують включення трьох копій на одну молекулу колагену амінокислоти цистеїну від одного до декількох сайтів, що допомагає у створенні правильної тримірної структури колагену та позитивно впливає на його біологічну активність. Введення одного або декількох залишків цистеїну в конструкції бактеріальних колагенів або до проксимальних ланок потрійного спірального домену, або безпосередньо в межах потрійного спірального домену ідеально підходить для конкретних модифікацій рекомбінантних білків, оскільки залишки цистеїну в бактеріальному колагені є рідкісними або відсутніми, але їх легко можна закодувати у векторній конструкції ДНК. Можливі й інші способи модифікації або зшивання бактеріальних колагенів. Наприклад, потрійній спіральній стабільності в молекулі колагену сприяє наявність вздовж молекули залишків амінокислоти лізину через участь в іонній взаємодії в умовах відсутності стабілізації гідроксипроліном. Отже, фрагменти колагенових білків можна зшивати за допомогою реакції із залишками амінокислоти лізину, що забезпечує потрійну спіралізацію рекомбінантного білка. Схожого ефекту можна досягти використанням біфункціональних малеїмідних або вінілсульфонових реагентів, але у цьому разі не можна отримати желеподібні структури колагену [13].

Колаген, синтезований на *S. Pyogenes,* має гарні характеристики при застосуванні не лише рекомбінантних методів, а й хімічної модифікації. Усе це забезпечує вихід потрійноспіралізованого білка, властивості якого можна визначити відповідними хімічними модифікаціями.

Колаген з *Escherichia coli*. Розроблена успішна технологія включення генних субодиниць людської проліл-4-гідроксилази в E. coli. Цей конструкт також містить у собі джерело експресії аскорбат-подібних речовин, що необхідні для активності проліл-4-гідроксилази [14]. Отримана генна конструкція забезпечила успішну експресію в клітинах E. coli дрібних

колагеноподібних пептидів та потрійної спіралі, що містить білок адипонектин, а також у малих людських колагеноподібних білкових фрагментів. Для синтезу великих фрагментів людського колагену типу III використаний генетичний конструкт, що містить генні послідовності пролілу мімівірусу та лізил гідроксилази E. coli. Це дозволило отримати фрагмент колагену, що містить гідроксипролін та гідроксилізин. На моделі кишкової палички можна отримувати бактеріальні колагеноподібні білки, оскільки порівняно легко конструювати експресійні системи, вносити необхідні модифікації для формування правильної трьохспіральної структури. Такі експресійні бактеріальні білки колагену мають стабільність, близьку до тієї, що характерна для колагенів тваринного походження, незважаючи на відсутність гідроксилювання проліну. Бактеріальні конструкції є меншими і простішими в маніпулюванні, ніж послідовності тваринних колагенів повної довжини, і вони дозволяють включати більші елементи досліджуваних послідовностей для модифікацій, ніж це можливо в пептидні системи [15].

Дослідження *de novo* сконструйованого рекомбінантного колагену, експресованого в *E. coli*, показали важливість повторюваних ділянок в межах потрійної спіралі для генерування аксіально-повторювальних фібрил. Визначення стійкості колагену було використано для розроблення 36-триплетного сегмента, що включає колагенові послідовності типу I з високою схильністю до формування потрійної спіралі. Цю 36-триплетну послідовність повторювали три рази, розділивши послідовністю амінокислот гліцин-пролін-пролін так, що їх кількість складала 4 повтори в кінцевій рекомбінантній конструкції. На С-кінці білку була включена послідовність фольдону для підтримки тримеризації, але після експресії на стадії очистки білку він був протеолітично видалений. Усі ці модифікації забезпечили стабільне формування потрійної спіралі колагену в *E. coli*, що міг агрегуватися у фібрилярні структури з осьовою періодичністю близько 35 нм. Аналіз отриманих результатів дозволив зробити висновок, що утворена структура має вигляд спіралі та повторювальних четвертинних структур, була сформована

завдяки 36-триплетному повтору і, ймовірніше за все, за допомогою електростатичних взаємодій [16].

Експресійна система на основі *E. coli* забезпечує вихід колагеноподібних білків із визначеним складом та структурою, що є надзвичайно важливим для біомедичного та косметичного застосування.

Колаген рослинного походження. Біотехнологія рослин має велике значення для вирішення проблем забезпечення населення достатньою кількістю харчових продуктів, подолання наслідків екологічних та природних змін, що впливають на врожайність рослин, які мають сільськогосподарське значення. Із розвитком та удосконаленням методів та інструментів генної інженерії у поєднанні зі зростаючим попитом на медичні матеріали, дозволило розвивати дослідження у напрямі використання трансгенних рослин для отримання біоматеріалів, що мають біофармацевтичне значення.

На моделі рослини тютюну було розроблено технологію отримання колагену I типу. Хоча рослини тютюну мають проліл-4-гідроксилазу для гідроксилювання залишків проліну, проте рівень продукції усього ферменту не є достатнім для гідроксилювання людського колагену до природного рівня, що обумовлює необхідність розроблення генно-інженерних рослин, які б виробляли замість рослинної проліл-4-гідроксилази людську. Як було описано вище, для правильної компартменталізації білка колагену в його первинній структурі необхідна обов'язкова наявність залишків лізину, що обумовлює внесення в рослинну експресійну систему гену лізил гідроксилази. Не зважаючи на громіздкість перерахованих елементів конструкту, не слід забувати про те, що, на відміну від *E. coli*, розмір векторної системи на основі плазміди якої обмежений, трансформація рослин опосередкована бактеріями роду *Agrobacterium*, що дозволяє трансфікувати набагато більші генетичні послідовності в клітини рослин [17]. Ця властивість векторів на основі *Agrobacterium tumefaciens* дозволяє експресувати повнорозмірний проколаген1α1, проколаген1α2 разом з обома субодиницями проліл-4-гідроксилази та лізил гідроксилази всередині однієї рослинної клітини. Для регуляції

експресії проколагенових білків додатково вносять сигнальні пептиди в субклітинні компартементи, зокрема вакуолі. Так, отримана експресійна система забезпечує гідроксилювання як проліну, так і лізину до рівнів, що відповідають колагену людського типу I. Крім того, трансгенні рослини тютюну синтезували колаген, що міг формувати фібрили. Особливістю даного методу є необхідність вирівнювання колагенових фібрил для поліпшення механічних властивостей колагену. Для цього на етапі утворення рідкокристалічної форми колагену проводили екструзії. Це дозволило отримати фібрили подібні до природних сухожиль. Для синтезованого колагену на моделі рекомбінантних рослин тютюну на сьогодні проводять дослідження в галузі розроблення носіїв для препаратів для загоєння ран та відновлення пошкоджених тканин [18]. Ще однією перспективною розробкою є створення рекомбінантних рослин кукурудзи для отримання гідроксильованого рекомбінантного пептиду проколагену 1α1 людини із порівнянним вмістом гідроксипроліну з природнім людським колагеном 1α1. На сьогодні ще не розроблено на стільки ж ефективну технологію продукції людського колагену на трансгенній кукурудзі, як на рослинах трансгенного тютюну. Проте продемонстровано значний потенціал рослин трансгенної кукурудзи, що може бути основою для розроблення інших трансгенних рослин для експресії колагену [19].

Рослинні трансгенні технології демонструють високу ефективність у синтезі людського колагену. Важливо відзначити, що отриманий колаген є повнорозмірним, володіє дуже близькими до людського колагену характеристиками. Висока біологічна активність, низька антигенність відкривають широкі перспективи застосування рослинного колагену в біологічній та медичній галузях промисловості та науки.

Висновки. Колаген — білок з унікальними властивостями, що має широкий спектр застосування у різних галузях, зокрема у харчовій, медичній, біологічній, косметологічній тощо. Для задоволення потреб харчової промисловості достатньо виробництва білка колагену з тваринної сировини, зокрема відходів м'ясного виробництва. Однак навіть оброблення колагену тва-

ринного походження може підвищити його біологічну якість, що може розширити його застосування.

Проте медична, біологічна та косметологічна галузі вимагають ширшого діапазону біологічних властивостей колагенових білків. Ці властивості може забезпечити отримання колагену з морської сировини, а також мікробіологічний та рослинний синтез колагену. Морські технології пропонують розширений діапазон використання колагену у косметологічній галузі, адже з морських біооб'єктів можна синтезувати колагени з різними фізико-хімічними властивостями, а отже, їх можна використовувати у кремах, мазях та гелях. Проте виробництво колагену з морських ресурсів є трудомістким і тривалим, а тому існує потреба в пошуку швидких та дешевих джерел колагену, що будуть забезпечувати високу біологічну якість білку.

Найперспективнішим є мікробний та рослинний синтез колагенових білків. Так, за допомогою мікроорганізмів бактерій та мікроскопічних грибів можна отримувати колагени визначеної структури, конформації та розчинності. Крім того, на моделі отримання рекомбінантних колагенів з організмів дріжджів та бактерій можна проводити додаткові генно-інженерні та хімічні модифікації, що забезпечує вихід високоякісного білку із визначеними параметри. Це має велике значення для розроблення препаратів для лікування ран, опіків, механічних ушкоджень м'яких тканин, а також для лікування діабетичної стопи.

Альтернативним методом отримання рекомбінантного колагену є використання трансгенних рослин тютюну та кукурудзи. Вони демонструють високий вихід білка колагену, схожого за властивостями до людського. Цікавим є те, що, на відміну від мікробних систем експресії, саме рослинна система експресії може забезпечити ефективний вихід повнорозмірного білка.

Отже, біотехнологічні методи можуть забезпечити ефективний синтез колагену та колагеноподібних білків для біомедичного, фармацевтичного та косметологічного застосування. Є важливим та актуальним розроблення нових рекомбінантних систем експресії для можливості достатнього забезпечення попиту на якісні та ефективні препарати колагену.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Алдабергенов Д. С., Имирова Г. Н., Устенова Г. О. Перспективы применения фибриногена и коллагена в фармацевтической технологии. Вестник Казахского Национального медицинского университета, 2016. № 3. С. 208–210.

2. Зайцева Е. Л., Токмакова А. Ю., Тюльпаков А. Н., Петров В. М., Воронкова И. А., Галстян Г. Р., Мокрышева Н. Г. Особенности экспрессии генов коллагена и типов на различных этапах репарации ран нижних конечностей у лиц с нейропатической формой синдрома диабетической стопы. In Сахарный диабет: макро- и микрососудистые осложнения. 2017. С. 35–35.

3. Гонський Я., Максимчук Т. Біохімія людини: підручник. «Укрмедкнига», 2019. С. 656–658.

4. Sajna K. V., Gottumukkala L. D., Sukumaran R. K., Pandey A. (2015). White biotechnology in cosmetics. In Industrial Biorefineries & White Biotechnology (pp. 607–652). Elsevier.

5. Юнусов Э. Ш., Пономарев В. Я., Морозова С. А., Ежкова Г. О. Изучение гидролиза коллагенсодержащего сырья протеолитическими ферментами. Вестник Казанского технологического университета, 2016. № 19(24). С. 168–170.

6. Akram A. N., Zhang C. (2020). Extraction of collagen-II with pepsin and ultrasound treatment from chicken sternal cartilage; physicochemical and functional properties. Ultrasonics Sonochemistry, 105053.

7. Ramanathan G., Singaravelu S., Muthukumar T., Thyagarajan S., Perumal P. T., Sivagnanam U. T. (2017). Design and characterization of 3D hybrid collagen matrixes as a dermal substitute in skin tissue engineering. Materials Science and Engineering: C, 72, 359–370.

8. Пивненко Т. Н., Позднякова Ю. М., Ковалев А. Н. Исследование способов получения низкомолекулярного коллагена из медузы ропилемы Rhopilema asamushi. Научные труды Дальрыбвтуза, 2017. № 43. С. 74–82.

9. Gellermann P., Schneider-Barthold C., Bolten, S. N., Overfelt E., Scheper T., & Pepelanova I. (2019). Production of a Recombinant Non-Hydroxylated Gelatin Mimetic in Pichia pastoris for Biomedical Applications. Journal of functional biomaterials, 10(3), 39–51.

10. Que R. A., Chan S. W. P., Jabaiah A. M., Lathrop R. H., Da Silva N. A.,& Wang S. W. (2015). Tuning c, ellular response by modular design of bioactive domains in collagen. Biomaterials, 53, 309–317.

11. Wang T., Lew J., Premkumar J., Poh C. L.,& Naing M. W. (2017). Production of recombinant collagen: state of the art and challenges. Engineering Biology, 1(1), 18–23.

12. Mirzaei M., Mirdamadi S., Safavi M., Zare D., Hadizadeh M.,& Asadi M. M. (2019). Synthesis, in vitro and cellular antioxidant activity evaluation of novel peptides derived from Saccharomyces cerevisiae protein hydrolysate: structure-function relationship. Amino acids, 51(8), 1167–1175.

13. Stoichevska V., Peng Y. Y., Vashi A. V., Werkmeister J. A., Dumsday G. J., & Ramshaw J. A. (2017). Engineering specific chemical modification

sites into a collagen-like protein from Streptococcus pyogenes. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 105(3), 806–813.

14. Shi J., Ma X., Gao Y., Fan D., Zhu C., Mi Y.,& Xue W. (2017). Hydroxylation of human type III collagen alpha chain by recombinant coexpression with a viral prolyl 4-hydroxylase in Escherichia coli. The protein journal, 36(4), 322–331.

15. Brodsky B.,& Ramshaw J. A. (2017). Bioengineered collagens. In Fibrous Proteins: Structures and Mechanisms (pp. 601–629). Springer, Cham.

16. Kaur P. J., Strawn R., Bai H., Xu K., Ordas G., Matsui H., Xu Y. (2015). The self-assembly of a mini-fibril with axial periodicity from a designed collagen-mimetic triple helix. Journal of Biological Chemistry, 290(14), 9251–9261.

17. Brodsky B.,& Kaplan D. L. (2013). Shining light on collagen: Expressing collagen in plants. Tissue Engineering Part A, 19(13–14), 1499–1501.

18. Yaari A., Posen Y.,& Shoseyov O. (2013). Liquid crystalline human recombinant collagen: the challenge and the opportunity. Tissue Engineering Part A, 19(13–14), 1502–1506.

19. Gerasimova S. V., Smirnova O. G., Kochetov A. V., & Shumnyi V. K. (2016). Production of recombinant proteins in plant cells. Russian journal of plant physiology, 63(1), 26–37.