

BIOTECHNOLOGY

VOL. 3, N5, 2010

BIMONTHLY

Редакційна колегія

Комісаренко Сергій Васильович
(головний редактор)
Стойка Ростислав Степанович
(заст. головного редактора)
Колибо Денис Володимирович
(заст. головного редактора)
Виноградова Олена Сергіївна
(відповідальний секретар)
Гончар Михайло Васильович
Дзядевич Сергій Вікторович
Дробот Людмила Борисівна
Карпов Олександр Вікторович
Кунах Віктор Анатолійович
Кучук Микола Вікторович
Левицький Євген Леонідович
Лукаш Любов Леонідівна
Матишевська Ольга Павлівна
Мельничук Максим Дмитрович
Мінченко Олександр Григорович
Солдаткін Олексій Петрович
Товкач Федір Іванович
Філоненко Валерій Вікторович

Редакційна рада

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

Адреса редакції:

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

*Свідоцтво про державну реєстрацію друкованого засобу масової інформації
серія КВ №10391 від 14.09.2005*

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

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

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

Підписано до друку 11.11.2010. Формат 210×297. Папір крейд. 115 г/м².

Гарн. SchoolBookC. Друк — цифровий. Обл.-вид. арк. 11,06.

Наклад 200 прим. Замовлення 5/6.

Оригінал-макет підготовлено в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України;
друк — ФОП Шамарін О.М.

БІОТЕХНОЛОГІЯ

Науковий журнал

Виходить один раз на два місяці

БИОТЕХНОЛОГИЯ / BIOTECHNOLOGY

Том 3, №5, 2010

ЗМІСТ

ОГЛЯДИ

- Колодзейська М. В.*
Юсова О. І.
Гриненко Т. В. Мезотромбін — похідне протромбіну —
Na⁺-залежний алостеричний ензим. 9
- Сидоров Ю. І.* Фотобіореактори. 19
- Бурлака О. М.*
Сорочинський Б. В. Біофортифікація сільськогосподарських рослин . . . 31
- Снежкін Ю. Ф.*
Петрова Ж. О. Харчові порошки з рослинної сировини.
Класифікація, методи отримання, аналіз ринку 43

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ СТАТТІ

- Редчук Т. А.*
Короткевич Н. В.
Кабернюк А. А.
Олійник О. С.
Лабинцев А. Ю.
Романюк С. І.
Колибо Д. В.
Комісаренко С. В. Рекомбінантний химерний протеїн MPB63-MPB83 —
перспективний антиген
для діагностики туберкульозу. 50
- Галкін О. В.*
Мінченко О. Г. Активація транскрипції гена EGR2 в генетично
модифікованих клітинах з надекспресією
транскрипційного фактора ZXDC 57

<i>Конвалюк І. І.</i> <i>Кравець Н. Б.</i> <i>Дробик Н. М.</i> <i>Мельник В. М.</i> <i>Кунах В. А.</i>	Прямий органогенез <i>in vitro</i> тирличу жовтого (<i>Gentiana lutea</i> L.)	66
<i>Сахно Л. А.</i> <i>Моргун Б. В.</i> <i>Кваско Є. Ю.</i> <i>Кучук Н. В.</i>	Створення трансформованих рослин ріпаку, що експресують ген <i>cyp11A1</i> цитохрому P450 _{sc} тваринного походження	74
<i>Коваленко О. Г.</i> <i>Поліщук О. М.</i> <i>Вассер С. П.</i>	Глікани вищого базидіального гриба <i>Ganoderma adspersum</i> (Schulzer) Donk: отримання та антифітовірусна активність	83
МЕТОДИ		
<i>Стойко В. І.</i> <i>Жданова Н. М.</i> <i>Айзенберг В. Л.</i> <i>Капічон Г. П.</i>	Оптимізація культивування <i>Penicillium</i> sp. 225 та <i>Aspergillus</i> sp. 8 TX — продуцентів позаклітинної інулінази	92
<i>Горбунов Л. В.</i> <i>Саліна А. С.</i> <i>Клещев Н. Ф.</i>	Оптимізація кріоконсервування ембріонів миші . . .	100
РЕЦЕНЗІЇ		
<i>Левицький Є. Л.</i>	Рецензія на монографію В. А. Кунаха «Розвиток генетики в Національній академії наук України» (Київ: Академперіодика, 2009)	106
<i>Курдиш І. К.</i>	Рецензія на монографію Л. Д. Варбанець, Н. В. Борзової «Глікозидази мікроорганізмів та методи їх дослідження» (Київ: Наукова думка, 2010)	110
НОВИНИ		112
НОВІ ПУБЛІКАЦІЇ З БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА СУМІЖНИХ ДИСЦИПЛІН		123
КОНФЕРЕНЦІЇ, З'ЇЗДИ, СИМПОЗИУМИ, ВИСТАВКИ		133

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

- Колодзейская М. В.*
Юсова Е. И.
Гриненко Т. В. Мезотромбин — производное протромбина —
Na⁺-зависимый аллостерический фермент 9
- Сидоров Ю. И.* Фотобиореакторы 19
- Бурлака О. М.*
Сорочинский Б. В. Биофортификация сельскохозяйственных
растений 31
- Снежкин Ю. Ф.*
Петрова Ж. О. Пищевые порошки из растительного сырья.
Классификация, методы получения, анализ рынка . . . 43

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Редчук Т. А.*
Короткевич Н. В.
Кабернюк А. А.
Олейник Е. С.
Лабынцев А. Ю.
Романюк С. И.
Колибо Д. В.
Комисаренко С. В. Рекомбинантный химерный протеин
MPB63-MPB83 — перспективный антиген
для диагностики туберкулеза 50
- Галкин А. В.*
Минченко А. Г. Активация транскрипции гена EGR2 в генетически
модифицированных клетках со сверхэкспрессией
транскрипционного фактора ZXDC 57
- Конвалюк И. И.*
Кравец Н. Б.
Дробык Н. М.
Мельник В. Н.
Кунах В. А. Прямой органогенез *in vitro* горечавки желтой
(*Gentiana lutea* L.) 66
- Сахно Л. А.*
Моргун Б. В.
Кваско Е. Ю.
Кучук Н. В. Создание трансформированных растений рапса,
экспрессирующих ген *sup11A1* цитохрома p450_{scc}
животного происхождения 74

<i>Коваленко А. Г.</i> <i>Полищук О. Н.</i> <i>Вассер С. П.</i>	Гликаны высшего базидиального гриба <i>Ganoderma adspersum</i> (Schulzer) Donk: получение и антифитовирусная активность 83
---	--

МЕТОДЫ

<i>Стойко В. И.</i> <i>Жданова Н. Н.</i> <i>Айзенберг В. Л.</i> <i>Капичон А. П.</i>	Оптимизация культивирования <i>Penicillium</i> sp. 225 и <i>Aspergillus</i> sp. 8 ТХ — продуцентов внеклеточной инулиназы 92
---	--

<i>Горбунов Л. В.</i> <i>Салина А. С.</i> <i>Клещев Н. Ф.</i>	Оптимизация криоконсервирования эмбрионов мыши 100
---	---

РЕЦЕНЗИИ

<i>Левицкий Е. Л.</i>	Рецензия на монографию В. А. Кунаха «Розвиток генетики в Національній академії наук України» (Київ: Академперіодика, 2009) 106
-----------------------	--

<i>Курдиш И. К.</i>	Рецензия на монографию Л. Д. Варбанец, Н. В. Борзовой «Глікозидази мікроорганізмів та методи їх дослідження» (Київ: Наукова думка, 2010) 110
---------------------	---

НОВОСТИ	112
--------------------------	-----

НОВЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО БИОТЕХНОЛОГИИ И СМЕЖНЫМ ДИСЦИПЛИНАМ	123
--	-----

КОНФЕРЕНЦИИ, СЪЕЗДЫ, СИМПОЗИУМЫ, ВЫСТАВКИ	133
--	-----

CONTENTS

REVIEWS

- Kolodzeiskaia M. V.*
Yusova E. I.
Grinenko T. V. Meizothrombin, namely a derivate of prothrombin,
is a Na⁺-dependent allosteric enzyme 9
- Sidorov Yu. I.* Photobioreactors 19
- Burlaka O. M.*
Sorochinsky B. V. Biofortification of food plants 31
- Snezhkin Yu. F.*
Petrova Zh. O. Food powders from plant raw materials.
Classification, methods of receipt, market analysis. . . . 43

EXPERIMENTAL ARTICLES

- Redchuk T. A.*
Korotkevich N. V.
Kaberniuk A. A.
Oliinyk O. S.
Labyntsev A. J.
Romaniuk S. I.
Kolibko D. V.
Komisarenko S. V. Recombinant chimera protein MPB63-MPB83 —
as perspective antigen for diagnostics
of tuberculosis. 50
- Galkin O. V.*
Minchenko O. H. Activation of EGR2 gene transcription in genetically
modified cells with over expression of transcription
factor ZXDC 57
- Konvalyuk I. I.*
Kravets N. B.
Drobyk N. M.
Mel'nyk V. M.
Kunakh V. A. Direct organogenesis *in vitro* of *Gentiana lutea* L. 66
- Sakhno L. O.*
Morgun B. V.
Kvasko O. Yu.
Kuchuk M. V. Creation of transformed rape plants that express
cyp11A1 cytochrome p450_{sc} gene of animal origin 74

<i>Kovalenko O. G.</i>	Glycans of higher Basidiomycetes mushroom	
<i>Polishchuk E. N.</i>	<i>Ganoderma adspersum</i> (Schulzer) Donk:	
<i>Wasser S. P.</i>	isolation and antyphytoviral activity	83

METHODS

<i>Stoiko V.</i>	Optimization of cultivation of <i>Penicillium</i> sp. 225	
<i>Zhdanova N.</i>	and <i>Aspergillus</i> sp. 8 TX synthesizing	
<i>Aisenberg V.</i>	exoinulinaze	92
<i>Kapichon A.</i>		

<i>Gorbunov L. V.</i>	Optimization of cryopreservation	
<i>Salina A. S.</i>	of mouse embryos	100
<i>Kleshchev N. F.</i>		

NOTICES

<i>Levitsky E. L.</i>	Review on the monograph of V. A. Kunakha «Development of geneticists in National academy of sciences of Ukraine» (Kyiv: Akadempriodika, 2009)	106
-----------------------	--	-----

<i>Kurdish I. K.</i>	Review on the monograph of L. D. Varbanec, N. V. Borzova «Glycosidases of microorganisms and methods of their research» (Kyiv: Naukova dumka, 2010)	110
----------------------	--	-----

NEWS		112
-------------	--	-----

NEW PUBLICATIONS ON BIOTECHNOLOGY AND ADJOINING BRANCHES OF SCIENCE		123
--	--	-----

CONFERENCES, CONGRESSES, SYMPOSIA, EXHIBITIONS		133
---	--	-----

УДК 577.157.2

МЕЗОТРОМБИН — ПРОИЗВОДНОЕ ПРОТРОМБИНА — Na⁺-ЗАВИСИМЫЙ АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЙ ЭНЗИМ

М. В. КОЛОДЗЕЙСКАЯ, Е. И. ЮСОВА, Т. В. ГРИНЕНКО

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

E-mail: yusova07@mail.ru

Согласно современным представлениям о механизме активации протромбина проэнзим и его промежуточная активная форма мезотромбин находятся в альтернативных конформациях, определяющих последовательное расщепление двух пептидных связей в молекуле протромбина, необходимых для его превращения в тромбин. Конформация протромбина является оптимальной для расщепления связи Arg 320-Phe321, в то время как мезотромбина — Arg 271-Thr272.

Мезотромбин, в отличие от тромбина, имеет слабовыраженные прокоагулянтные свойства и повышенную антикоагулянтную активность, опосредованную тромбомодулинзависимой активацией протеина С. Он может регулировать фибринолитический процесс через тромбомодулинзависимую активацию ингибитора фибринолиза (ТАФИ).

Мезотромбин, подобно тромбину, взаимодействует с фибриногеном, тромбомодулином и протеином С. Его специфичность зависит от связывания ионов натрия. Обнаружено, что своеобразные прокоагулянтные свойства мезотромбина — активация факторов V и VIII на мембранах и антикоагулянтные, обусловленные активацией связанного с тромбомодулином протеина С, регулируются Na⁺ как эффектором его каталитической функции. Кроме того, Na⁺ влияет на активность мезотромбина, увеличивая сродство лигандов к экзосайту I и направляя активацию протромбина на образование тромбина непосредственно из быстрой формы мезотромбина. Na⁺-зависимая аллостерия мезотромбина раскрывает новые подходы для регуляции его активности и специфичности действия.

Ключевые слова: протромбин, мезотромбин, фактор V свертывания крови, экзосайты I и II тромбина, связывание Na⁺, аллостерическая регуляция.

Протеиназа свертывания крови — тромбин появляется в плазме после расщепления протромбина протромбиназным комплексом, в состав которого входят факторы Ха и Va, фосфолипиды и ионы кальция [1, 2]. Скорость реакции превращения протромбина в тромбин, катализируемой фактором Ха, повышается в ~300 000 раз в сочетании с протеиновым кофактором, фактором Va и ионами кальция. Фактор Va в протромбиназном комплексе регулирует последовательность расщепления пептидных связей в процессе активации протромбина, определяя гидролиз фактором Ха связи Arg 320-Phe 321 в протеиназном домене и генерацию каталитически активного промежуточного мезотромбина, а также последующий гидролиз связи Arg 271-Thr 272 между каталитическим доменом и фрагментом 1–2 протромбина, продуцируя тромбин и фрагмент 1–2 [2–5]. В отсутствие фактора Va преобладает

более медленный путь активации протромбина, при котором первоначальное расщепление в положении Arg 271 приводит к образованию неактивного промежуточного протромбина 2, в котором отщепленный фрагмент 1·2 нековалентно связан с основной частью молекулы, а последующее расщепление в положении Arg 320 — к образованию тромбина (схема).

Показано, что протромбин в протромбиназном комплексе может находиться в двух конформациях, определяющих последовательность расщепления пептидных связей фактором Ха. Конформационные изменения, сопровождающие появление каталитического центра при превращении протромбина в мезотромбин в протромбиназном комплексе, регулируют его активацию, обеспечивая переход конформационного состояния молекулы от зимогена к энзиму [6–14].

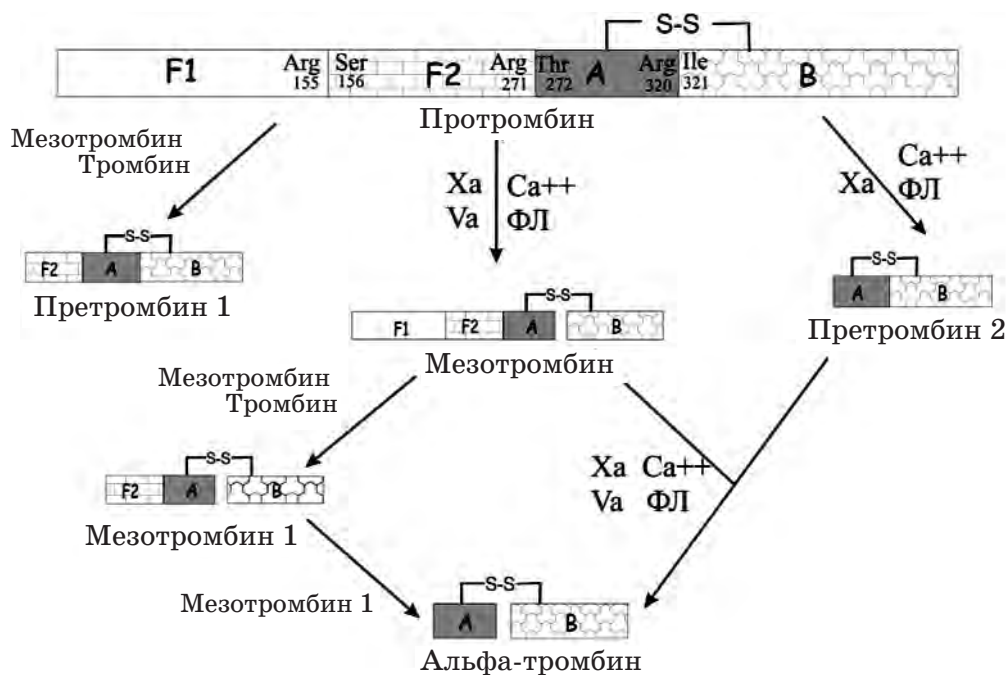


Схема процесса активации протромбина

Связывание кофактора Va с протромбином и фактором Ха необходимо для оптимальной функции протромбиназы при физиологических условиях. Основным механизмом, согласно которому фактор Va увеличивает каталитическую эффективность фактора Ха, является связывание энзима и субстрата, что приводит к структурным перестройкам вокруг расщепляемых пептидных связей и изменению их доступности. В составе протромбиназы фактор Va направляет фактор Ха для эффективного катализа протромбина [15–18]. В протромбиназном комплексе фактор Va оказывает двойной эффект — рецепторный и эффекторный. Рецепторный эффект фактора Va обусловлен взаимодействием с энзимом, связанным с мембраной, с образованием бинарного комплекса, в то время как эффекторный эффект более сложный и требует тщательного рассмотрения молекулярной динамики, связанной с функцией протромбиназы и обуславливающей экспрессию экзосайтов при активации протромбина. Взаимодействие протромбина с аминокислотными остатками фактора Va в составе протромбиназы может вызывать перераспределение аминокислотных остатков вокруг связи Arg320–Ile321 таким образом, что они становятся доступными для эффективного расщепления фактором Ха в составе протромбиназы [19–24].

В протромбиназном комплексе именно фактор Va направляет активацию протром-

бина фактором Ха на образование мезотромбина, при котором и происходит первоначальное расщепление связи в положении Arg 320 (путь MzT) [6,8,19,22].

Активация протромбина сопровождается экспонированием в молекуле тромбина регуляторных экзосайтов I и II. Предполагается, что фактор Va в составе протромбиназного комплекса непосредственно взаимодействует с проэксосайтом I протромбина [19]. В С-концевом фрагменте тяжелой цепи фактора Va (в пределах 659–698 аминокислотных остатков) находится участок связывания, комплементарный проэксосайту I протромбина. Эта область фактора Va содержит несколько сульфатированных тирозинов, необходимых для активации фактора как V тромбином, так и протромбина протромбиназным комплексом [23]. Показано, что пентапептид с аминокислотной последовательностью 695–699 (Asp-Tyr-Asp-Tyr-Gln) с С-конца тяжелой цепи фактора Va конкурентно ингибирует активацию протромбина протромбиназой. Электрофоретический анализ продуктов активации протромбина показал, что возрастающие концентрации пептида приводят к полному ингибированию образования мезотромбина. Вместе с тем имеет место генерация тромбина через образование претромбина 2. Полученные результаты позволили сделать вывод, что пептид ингибирует гидролиз протромбиназой пептидной связи в протромбине в положении

Arg 320. Для подтверждения этого факта была изучена активация молекул рекомбинантного протромбина rP-II (R155A/R284A/R271A) и rP₂-II (R155A/R284A/R320A), в которых могла быть гидролизована только одна связь в положении Arg 320 или Arg 271, соответственно. Обнаружено, что расщепление rP-II протромбиназой полностью ингибируется низкими концентрациями пентапептида, в то же время только высокие концентрации пептида необходимы для подавления активации rP₂-II. Пентапептид в отсутствие фактора Va также препятствует активации протромбина фактором Ха, связанным с мембраной, увеличивая при этом скорость гидролиза в положении Arg271 протромбина или rP₂-II. Эти данные подтверждают, что пентапептид Asp-Tyr-Asp-Tyr-Gln оказывает противоположное влияние на фактор Ха при гидролизе протромбина в зависимости от включения фактора Va в протромбиназу [23–26].

Было также установлено, что пептид гирудина Hir-54-65 (SO₃⁻) является специфическим ингибитором протромбиназы. Чтобы понять роль фактора Va в составе протромбиназы на молекулярном уровне, была изучена генерация тромбина в присутствии отдельно взятых фрагментов протромбина или их комбинации. Активация протромбина 1 протромбиназой — медленный процесс, в котором расщепление связей в положении Arg 320 и Arg 271 происходит с одинаковой скоростью. Прибавление очищенного фрагмента 1 к протромбину 1 повышает скорость гидролиза связи в положении Arg 320 и образование тромбина. Обе реакции ингибируются пептидом гирудина, тогда как пентапептид Asp-Tyr-Asp-Tyr-Gln не оказывает значительного ингибиторного эффекта на расщепление протромбина 1 в присутствии фрагмента 1 или без него. Аналогично, активация протромбина 2 протромбиназой ингибировалась Hir54-65 (SO₃⁻), но не пентапептидом. Прибавление очищенного фрагмента 1–2 к протромбину 2 повышает скорость его расщепления в положении Arg 320 протромбиназой, что приводит к значительному ингибированию пептидом Asp-Tyr-Asp-Tyr-Gln образования тромбина и одновременному подавлению ингибиторного эффекта пептидом гирудина. Далее было обнаружено, что тройной комплекс протромбин 2 — фрагмент 1–2 — Hir 54-65 (SO₃⁻) ингибируется пентапептидом. Приведенные дополнительные данные показали, что связывание фрагмента 1 с мембраной необходимо для усиления кофакторной активности фактора Va,

который, в свою очередь, приводит к эффективному расщеплению протромбина протромбиназой в положении Arg 320 [25–27].

При превращении протромбина в тромбин на поверхности энзима появляются два экзосайта — I и II — с положительно заряженными аминокислотными остатками, которые обеспечивают узнавание физиологических субстратов, ингибиторов и регуляторных молекул [5, 27–35]. Экзосайт I участвует в связывании энзима с фибриногеном, фибрином, 1-м и 4-м рецепторами, активируемыми протеиназой (PAR-1 и PAR-4), и COOH-концевым пептидом гирудина — 54–65 (SO₃⁻). Экзосайт II связывает гепарин и фрагмент 2 протромбина. Оба экзосайта участвуют в активации тромбином факторов V и VIII, гликопротеина Ib, инактивации тромбина кофактором II гепарина и связывают тромбомодулин [28–34].

Известно, что взаимодействие Na⁺ с тромбином аллостерически регулирует переход энзима из медленной (slow-) в быструю (fast-) форму [35–42]. Быстрая форма тромбина имеет более высокую каталитическую эффективность (k_{cat}/K_m) к прокоагулянтным субстратам (фибриноген, PAR-1), более высокую реактивность к антитромбину и увеличенную амидазную активность [40, 43]. Исследование аланинзамещенного мутантного тромбина и рентгеноструктурный анализ его быстрой и медленной форм дали возможность получить характеристику аллостерического перехода в быструю форму энзима: 1) расположение аминокислотных остатков, стабилизирующих сайт связывания Na⁺; 2) изменение в ориентации Asp 189 в сайте первичной субстратной специфичности; 3) перемещение боковой цепи Glu 192, которая связана сетью молекул воды с Ser 195; 4) изменение в ориентации Ser 195, который оптимизирует катализ [21, 24–26]. Подробно эта проблема обсуждалась в ряде публикаций Di Cera и соавт., в которых отмечено, что данные о структуре энзима согласуются с кинетическими исследованиями связывания Na⁺ [39, 44–47].

Сравнительные исследования взаимодействия С-концевого пептида гирудина Hir-(54–65) (SO₃⁻) с промежуточными формами протромбина показали появление и формирование в процессе активации проэнзима (про)экзосайта I. При удалении фрагмента 1 от протромбина отмечено 7-кратное увеличение сродства пептида гирудина к образующемуся протромбину 1, что указывает на появление экзосайта I. Дальнейшее увеличение сродства в 11–20 раз свидетельствует

о полном формировании экзосайта I, обуславливающим каталитическую активность мезотромбина и тромбина [21, 22, 48].

Количественный анализ связывания фрагментов протромбина 1–2 и 2 с экзосайтом II претромбина 2 и тромбина указывает, что этот участок становится открытым для взаимодействия с лигандами после расщепления связи в положении Arg 271 и последующей диссоциации фрагментов [21, 22]. На сегодняшний день достоверно не установлено, существует ли связь между Na^+ -связывающим сайтом и (про)экзосайтом I, который образуется во время активации протромбина.

Расщепление связи в положение Arg 320 протромбина или претромбина 1 инициирует формирование каталитического центра и (про)экзосайта I. Для выявления зависимости между Na^+ -связывающим сайтом и (про)экзосайтом I исследовали влияние ионов натрия на взаимодействие флуоресцентно меченого пептида гирудина [5F] Hir-(54–65) (SO_3^-) с продуктами активации протромбина. При сравнении протромбина, претромбинов 1 и 2 выявлено, что формирование (про)экзосайта I не зависит от присутствия Na^+ , в то время как гидролиз связи в положении Arg 320 приводит к тому, что сродство мезотромбина (MzT) и мезотромбина, лишённого фрагмента 1 (MzT(-F1), к пептиду гирудина возрастает в 8–10 и 5–6 раз соответственно в присутствии ионов натрия. Исследование кинетики гидролиза хромогенных субстратов продуктами активации протромбина впервые показало повышение скорости реакции ионами Na^+ для MzT и MzT(-F1), что свидетельствует об их аллостерической регуляции этим катионом. Полученные результаты дают основания для предположения, что своеобразная прокоагулянтная субстратная специфичность MzT, а именно активация факторов V и VIII, встроенных в мембрану, и антикоагулянтная активность, обусловленная активацией протеина C в комплексе с тромбомодулином, регулируется ионами Na^+ , вызывающими аллостерическое изменение конформации молекул MzT и MzT(-F1). Кроме того, данные о повышении активности MzT и сродства его экзосайта I к лигандам ионами Na^+ указывает на возможность их участия в активации протромбина, обеспечивая генерацию тромбина из быстрой формы MzT [21, 49–52].

Аллостерическая регуляция специфичности и активности тромбина ионами натрия предполагает, что различия в специфичности MzT также могут регулироваться переходом медленной формы MzT в быст-

рую. Увеличение сродства экзосайта MzT и его каталитической активности при связывании Na^+ влияет на узнавание MzT как субстрата протромбиназным комплексом. Можно полагать, что обнаруженное отсутствие связи между Na^+ -связывающим сайтом и (про)экзосайтом I объясняется неспособностью всех зимогенных форм: протромбина, претромбина 1 и претромбина 2 связывать Na^+ . Следует учитывать, что для проявления аллостерического эффекта ионов натрия необходимы конформационные изменения, которые имеют место в каталитическом домене при образовании активного центра [51–53]. Приведенные данные полностью согласуются со структурным анализом быстрой и медленной форм тромбина, нативных и инактивированных D-Phe-Pro-Arg- CH_2Cl и их комплексов с Hir-(54–65) (SO_3^-) [39, 54]. Изменение сродства экзосайта I к различным лигандам при взаимодействии тромбина с ионами натрия можно объяснить изменением конформации аминокислотных остатков в S1–S4-участках энзима, что обуславливает нарушение связи между Ser195 и His57.

Исследование влияния ионов натрия на скорость гидролиза хромогенного субстрата (D-Phe-Pip-Arg-pNA) тромбином, MzT^{R155A} и MzT(-F1) показало снижение сродства MzT^{R155A} к субстрату в присутствии Na^+ . Полученный результат авторы объясняют наличием в MzT^{R155A} фрагмента 1, который стерически или конформационно может влиять на активный центр, сайт связывания Na^+ или экзосайт I. Хотя механизм регуляции активности MzT^{R155A} ионами Na^+ не выяснен, впервые установлено, что MzT(-F1) и MzT^{R155A} являются Na^+ -регулируемыми протеиназами, демонстрирующими связь между натрий-связывающим участком и экзосайтом I.

Известно, что связывание ионов натрия с тромбином кардинально изменяет его специфичность по отношению к прокоагулянтным и антикоагулянтным субстратам [28–31, 36, 37]. Быстрая Na^+ -связанная форма тромбина эффективнее расщепляет фибриноген, фибрин, факторы V и VIII, PAR-1, в то время как медленная Na^+ -несвязанная форма энзима проявляет более высокую активность к протеину C [52]. MzT(-F1), несмотря на наличие активного центра и экзосайта I, имеет не более 10% активности тромбина по отношению к фибриногену и очень слабую способность (~2%) активировать тромбоциты [51]. Тромбин активирует фактор V как в растворе, так и связанный с фосфолипидными мембранами [27, 51, 55–58],

а MzT — только связанный с мембранами [27, 35, 50]. Учитывая факт, что активация фактора V осуществляется быстрой формой тромбина, можно полагать, что и MzT действует в этой форме и его активность регулируется ионами натрия. В условиях физиологической концентрации ионов натрия (140 мМ), pH и температуры константа диссоциации связывания Na^+ с тромбином составляет 110 мМ. Следовательно, 60% тромбина будет находиться в связанном с Na^+ состоянии в виде быстрой, а 40% — в свободном состоянии в виде медленной формы [38, 51, 59, 60]. Константа диссоциации связывания Na^+ с MzT не определена, хотя можно ожидать, что она будет аналогичной.

В комплексе тромбин–тромбомодулин медленная форма тромбина становится мощной антикоагулянтной протеиназой вследствие частичной потери специфичности по отношению к фибриногену и иным прокоагулянтным субстратам и значительного увеличения эффективности активации протеина C [28–31, 50–52]. Скорость активации протеина C протеиназами MzT и MzT(-F1) также усиливается тромбомодулином подобно тромбину и даже сильнее, если MzT связан с фосфолипидной мембраной. Это подтверждает важную физиологическую роль MzT как антикоагулянта. Появляется все больше данных, указывающих, что подобно тромбину Na^+ -связанная и свободная формы MzT могут проявлять более высокую прокоагулянтную или антикоагулянтную активность, соответственно [36, 48, 51].

Мезотромбин является физиологически активным промежуточным продуктом, генерация которого имеет место при расщеплении единственной связи в положении Arg 320 с образованием двух А- и В-цепей [25, 61]. В настоящее время появляется все больше доказательств, что мезотромбин, подобно тромбину, является Na^+ -активируемым энзимом. Рентгеноструктурный анализ кристаллического MzT(-F1) в комплексе с ингибитором активного центра PPACK (D-Phe-Pro-Arg-хлорметилкетон) показал, что структура Na^+ -связывающего сайта мезотромбина практически идентична таковому тромбина человека [19, 23, 24, 61]. Кроме того, кинетические исследования MzT(-F1), свидетельствующие о незначительном уменьшении k_{obs} при увеличении концентрации Na^+ , наблюдаемые при слабом изменении флуоресценции, подтверждают существование трех конформаций мезотромбина: неактивной MzT E*, активной E и активной Na^+ -связанной E· Na^+ , которые находятся в состо-

янии равновесия. Доказательство существования различных конформаций мезотромбина дает новую информацию о механизме активации протромбина [25, 62].

Современные исследования активации протромбина подтверждают механизм, в соответствии с которым он в зимогенном и протеиназном состоянии может существовать в альтернативной конформации, которая обеспечивает последовательное расщепление двух активационных связей в молекуле протеина [5, 38, 39]. Конформация зимогена является оптимальной для гидролиза связи в положении Arg 320, в то время как промежуточный продукт мезотромбин в протеиназной форме приобретает иную конформацию, обуславливающую расщепление связи в положении Arg 271. Основываясь на доказательстве роли проэкзосайта I в узнавании протромбина фактором Va и различной степени экспонирования экзосайта на зимогене и его протеиназных формах [19, 51–54], можно предполагать, что появление экзосайта I в мезотромбине может подготавливать субстрат для расщепления связи в положении Arg 271 [35, 36, 38].

Открытие мезотромбина как Na^+ -зависимого аллостерического энзима раскрывает новые подходы для регуляции его активности и специфичности. Впервые обнаружено, что своеобразная прокоагулянтная специфичность мезотромбина — активация факторов V и VIII, связанных с мембранами, и антикоагулянтная, обусловленная активацией протеина C в комплексе с тромбомодулином, регулируются Na^+ как эффектором каталитической функции энзима. Кроме того, Na^+ влияет на активность мезотромбина, увеличивая сродство экзосайта I к лигандам и направляя активацию протромбина на образование тромбина непосредственно из быстрой формы мезотромбина. Эта информация может быть использована для создания мутантных молекул с избирательной специфичностью к протеину C и моделирования активных участков ингибиторов тромбина.

Подобно тромбину, мезотромбин может выполнять две противоположные функции в процессе свертывания крови. Он может действовать как прокоагулянт, превращая фибриноген в нерастворимый фибрин, который удерживает тромбоциты в участке повреждения, способствуя первоначальным процессам заживления ран. Этот процесс, по-видимому, будет усиливаться активацией факторов V, VIII и XIII. Подобно тромбину, мезотромбин активирует протеин C, выполняя и антикоагулянтную функцию [63–66].

Известно, что связывание с тромбомодулином подавляет способность тромбина расщеплять фибриноген и PAR-1, но увеличивает более чем в 1 000 раз его специфичность по отношению к зимогену протеину С. Активированный протеин С гидролитически инактивирует факторы Va и VIIIa — основные кофакторы факторов Ха и IXa, необходимые для образования тромбина, тем самым подавляя оба (внешний и внутренний) пути свертывания крови. Кроме того, важные внутриклеточные реакции запускаются тромбином после расщепления рецепторов PAR-1 и PAR-4. Активация PAR-1 и PAR-4 тромбоцитов человека регулирует их активацию, агрегацию и высвобождение тромбоцитарных гранул.

Мы полагаем, что изучение механизма регуляции активности мезотромбина ионами натрия позволит получить дополнительные сведения о его физиологической функции. На основании данных о связывании Na^+ с тромбином при физиологических условиях можно утверждать, что более 50% мезотромбина будет находиться в связанном с Na^+ состоянии. Важно, что связывание Na^+ с энзимом необходимо для оптимального расщепления фибриногена, но не протеина С. Поэтому Na^+ -связанная форма мезотромбина ответственна за прокоагулянтную и, возможно, протромботическую и сигнальную функции, подобно тромбину. Вместе с тем Na^+ -свободная форма энзима является антикоагулянтной, поскольку проявляет активность к протеину С. Следовательно, степень насыщения ионами натрия этого промежуточного продукта активации протромбина обуславливает уровень его прокоагулянтной или антикоагулянтной активности. Прокоагулянтная функция Na^+ -связанной формы как тромбина, так и мезотромбина подтверждается данными о том, что генетические дефекты, вызывающие нарушение связывания Na^+ у протромбина Frankfurt, Salakta, Greenville, Scranton и др., сопровождаются кровотечениями. Интерес представляет то, что для антикоагулянтных мутантов как тромбина, так и мезотромбина, полученных в настоящее время, характерно нарушение в связывании Na^+ . Приведенные результаты подтверждают, что ионы Na^+ являются одним из регуляторов процесса свертывания крови. Изменение концентрации ионов натрия в плазме приводит к гипернатриемии $[\text{Na}^+] > 145$ или гипонатриемии $[\text{Na}^+] < 135$ mM и очень часто связано с тромбозами или кровотечениями, соответственно.

Следует отметить, что необходимы экспериментальные данные о структурных изменениях молекулы мезотромбина в Na^+ -связанной и Na^+ -свободной формах для объяснения механизма оптимизации прокоагулянтного действия мезотромбина ионами натрия.

Мезотромбин и мезотромбин des F1 являются активными лабильными интермедиами, быстро переходящими в тромбин, что затрудняет исследование *in vitro* этих двух промежуточных форм протеина. В связи с этим для изучения структурно-функциональных особенностей мезотромбина был получен ряд стабильных мутантных форм MzT и MzT des F1, в частности рекомбинантный протромбин (rII) и две мутантные формы мезотромбина: rMzT (R155A, R271A, R284A) и rMzT des F1 (R271A, R284A). Исследование активации протеина С в присутствии рекомбинантного растворимого тромбомодулина показало, что тромбомодулинзависимая стимуляция активации протеина С перечисленными протеинами в присутствии фосфолипидных везикул была для rMzT в 6 раз более мощной, чем для rIIa. В присутствии тромбомодулина rMzT также оказался более эффективным активатором TAFI (ингибитора фибринолиза, активированного тромбином). Все три энзима способны вызывать агрегацию тромбоцитов, вместе с тем значительно более высокие концентрации rMzT и rMzT des F1 требуются для достижения эффекта тромбина. Константа ингибирования скорости реакции второго порядка ($\text{m}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) для rIIa, rMzT и rMzT des F1 антитромбином III составляет $2,44 \cdot 10^5$, $6,10 \cdot 10^4$ и $1,05 \cdot 10^5$. Ингибирование rMzT и rMzT des F1 антитромбином III не усиливается гепарином. Поэтому можно предположить, что фрагмент 2 в составе молекулы блокирует в протеиназном домене анионсвязывающий экзосайт 2, который, как показано для тромбина, взаимодействует с гепарином. Таким образом, фрагмент 2 rMzT и rMzT des F1 предотвращает образование тройного комплекса антитромбин III-протеиназа-гепарин, необходимого для эффективного ингибирования антитромбином III. Более низкая константа ингибирования rMzT антитромбином III предполагает, что мутантные формы энзима имеют более длительный период полужизни в циркулирующей крови по сравнению с тромбином и на их ингибирование не должен влиять гепарин. В отличие от последнего, все три формы энзима *in vivo* подобным образом ингибируются.

лись гирудином. Приведенные данные в некоторой степени обеспечивают понимание функциональной роли фрагмента 1 и двух потенциальных анионсвязывающих экзосайтов мезотромбина. Так, заметная стимуляция фосфолипидными везикулами тромбомодулинзависимой активации протеина С rMzT, но не rMzT des F1 или rPa четко указывает на значение Gla-домена для взаимодействия с фосфолипидами. Допуская, что rMzT, rMzT des F1 и rPa взаимодействуют с тромбомодулином подобным образом, можно полагать, что экзосайт 1 в молекуле этих энзимов находится в функционально активном состоянии.

Таким образом, установлено, что нативный мезотромбин, его мутантные формы и тромбин обладают прокоагулянтной, антикоагулянтной и антифибринолитической активностью. Последние две определяются зависимой от тромбомодулина активацией протеина С и ТАФИ, соответственно. Доказано, что тромбин и мезотромбин проявляют неравноценную прокоагулянтную и антикоагулянтную активность. Данные об активации фибриногена, тромбоцитов и ТАФИ мезотромбином показали, что он менее эффективен,

по сравнению с тромбином, в проявлении прокоагулянтной и антифибринолитической активности. Антикоагулянтная активность мезотромбина, т. е. активация протеина С, близка таковой тромбина и превышает ее в несколько раз в отсутствие и присутствии фосфолипидов соответственно. Можно полагать, что мезотромбин играет важную роль в контроле гемостаза, отличающуюся от роли тромбина. Наиболее существенно это проявляется в мелких сосудах вследствие высокой концентрации тромбомодулина. Таким образом, активация протромбина приводит к генерации двух энзимов с уникальными свойствами, каждый из которых является компонентом различных систем. Одна из них, в которой преобладает мезотромбин, — антикоагулянтная и профибринолитическая, хотя ее действие ограничено уровнем активного протеина С. Другая, с преобладающей генерацией тромбина, будет прокоагулянтной и антифибринолитической. Приведенные данные дают основания считать, что на стадии активации тромбина может происходить переключение его функциональной активности от антикоагулянтной и профибринолитической к прокоагулянтной и антифибринолитической.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mann K. G., Nesheim M. E., Church W. R. et al. Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes // *Blood*. — 1990. — V. 76, N 1. — P. 1–16.
2. Rosing J., Zwaal R. F., Tans G. et al. Formation of meizothrombin as intermediate in Factor Xa-catalyzed prothrombin activation // *J. Biol. Chem.* — 1986. — V. 261, N 9. — P. 4224–4228.
3. Krishnaswamy S., Mann K. G., Nesheim M. E. The prothrombinase-catalyzed activation of prothrombin proceeds through the intermediate meizothrombin in an ordered, sequential reaction // *Ibid.* — V. 261, N 19. — P. 8977–8984.
4. Krishnaswamy S. Prothrombinase complex assembly. Contribution of protein-protein and protein-membrane interactions toward complex formation // *Ibid.* — 1990. — V. 265, N 7. — P. 3708–3718.
5. Krishnaswamy S. Exosite-driven substrate specificity and function in coagulation // *J. Thromb. Haemost.* — 2005. — V. 3, N 1. — P. 54–67.
6. Bianchini E. P., Orcutt S. J., Panizzi P. et al. Ratcheting of the substrate from the zymogen to proteinase conformations directs the sequential cleavage of prothrombin by prothrombinase // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2005. — V. 102, N 29. — P. 10099–10104.
7. Boskovic D. S., Krishnaswamy S. Exosite binding tethers the macromolecular substrate to the prothrombinase complex and directs cleavage at two spatially distinct sites // *J. Biol. Chem.* — 2000. — V. 275, N 49. — P. 38561–38570.
8. Wilkens M., Krishnaswamy S. The contribution of Factor Xa to exosite-dependent substrate recognition by prothrombinase // *Ibid.* — 2002. — V. 277, N 11. — P. 9366–9374.
9. Orcutt S. J., Pietropaolo C., Krishnaswamy S. Extended interactions with prothrombinase enforce affinity and specificity for its macromolecular substrate // *Ibid.* — 2002. — V. 277, N 48. — P. 46191–46196.
10. Orcutt S. J., Krishnaswamy S. Binding of substrate in two conformations to human prothrombinase drives consecutive cleavage at two sites in prothrombin // *Ibid.* — 2004. — V. 279, N 52. — P. 54927–54936.
11. Bajzar L., Manuel R., Nesheim M. E. Purification and characterization of TAFI, a thrombin activable fibrinolysis Inhibitor // *Ibid.* — 1995. — V. 270, N 24. — P. 14477–14484.
12. Cote H. C. F., Bajzar L., Stevens W. K., Samis J. Functional characterization of recombinant human meizothrombin and Meizothrombin(desF1). Thrombomodulin-dependent activation of protein C and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI), platelet aggregation, antithrombin-III inhibition // *Ibid.* — 1997. — V. 272, N 10. — P. 6194–6200.
13. Cote H. C. F., Stevens W. K., Bajzar L. et al. Characterization of a stable form of human

- meizothrombin derived from recombinant prothrombin (R155A, R271A and R284A) // *Ibid.* — 1994. — V. 269, N 15. — P. 11374–11380.
14. *Stevens W. K., Cote H. C. F., MacGillivray R. T. A., Nesheim M. E.* Calcium ion modulation of meizothrombin autolysis at Arg55–Asp56 and catalytic activity // *Ibid.* — 1996. — V. 271, N 14. — P. 8062–8067.
 15. *Brufatto N., Nesheim M. E.* Analysis of the kinetics of prothrombin activation and evidence that two equilibrating forms of prothrombinase are involved in the process // *Ibid.* — 2003. — V. 278, N 9. — P. 6755–6764.
 16. *Boskovic D. S., Bajzar L. S., Nesheim M. E.* Channeling during prothrombin activation // *Ibid.* — 2001. — V. 276, N 31. — P. 28686–28693.
 17. *Hortin G. L.* Sulfation of tyrosine residues in coagulation Factor V // *Blood.* — 1990. — V. 76, N 5. — P. 946–952.
 18. *Michnick D. A., Pittman D. D., Wise R. J., Kaufman R. J.* Identification of individual tyrosine sulfation sites within factor VIII required for optimal activity and efficient thrombin cleavage // *Ibid.* — 1994. — V. 269, N 31. — P. 20095–20102.
 19. *Anderson P. J., Nasset A., Dharmawardana K. R., Bock P. E.* Role of proexosite I in Factor Va-dependent substrate interactions of prothrombin activation // *J. Biol. Chem.* — 2000. — V. 275, N 22. — P. 16435–16442.
 20. *Boskovic D. S., Troxler T., Krishnaswamy S.* Active site-independent recognition of substrates and product by bovine prothrombinase: a fluorescence resonance energy transfer study // *Ibid.* — 2004. — V. 279, N 20. — P. 20786–20793.
 21. *Anderson P. J., Nasset A., Bock P. E.* Effects of activation peptide bond cleavage and fragment 2 interactions on the pathway of exosite I expression during activation of human prothrombin 1 to thrombin // *Ibid.* — 2003. — V. 278, N 45. — P. 44482–44488.
 22. *Anderson P. J., Bock P. E.* Role of prothrombin fragment 1 in the pathway of regulatory exosite I formation during conversion of human prothrombin to thrombin // *Ibid.* — 2003. — V. 278, N 45. — P. 44489–44495.
 23. *Chen L., Yang L., Rezaie A. R.* Proexosite-1 on prothrombin is a factor Va-dependent recognition site for the prothrombinase complex // *Ibid.* — 2003. — V. 278, N 30. — P. 27564–27569.
 24. *Beck D. O., Bukys M. A., Singh L. et al.* The contribution of amino acid region ASP695–TYR698 of factor V to procofactor activation and factor Va function // *Ibid.* — 2004. — V. 279, N 4. — P. 3084–3095.
 25. *Kamath P., Krishnaswamy S.* Fate of membrane-bound reactants and products during the activation of human prothrombin by prothrombinase // *Ibid.* — 2008. — V. 283, N 44. — P. 30164–30173.
 26. *Bukys M. A., Orban T., Kim P. Y. et al.* The interaction of fragment 1 of prothrombin with the membrane surface is a prerequisite for optimum expression of factor Va cofactor activity within prothrombinase // *J. Thromb. Haemost.* — 2008. — V. 99, N 3. — P. 511–522.
 27. *Bukys M. A., Orban T., Kim P. Y. et al.* The structural integrity of anion binding exosite I of thrombin is required and sufficient for timely cleavage and activation of factor V and factor VIII // *J. Biol. Chem.* — 2006. — V. 281, N 27 — P. 18569–18580.
 28. *Page M. J., Maegillivray R. T., Di Cera E.* Determinants of specificity in coagulation proteases // *J. Thromb. Haemost.* — 2005. — V. 3, N 11. — P. 2401–2408.
 29. *Huntington J. A.* Molecular recognition mechanisms of thrombin // *Ibid.* — 2005. — V. 3, N 8. — P. 1861–1872.
 30. *Bode W.* The structure of thrombin, a chameleon-like proteinase. // *Ibid.* — 2005. — V. 3, N 11. — P. 2379–2388.
 31. *Bode W.* Structure and interaction modes of thrombin // *Blood Cells Mol. Dis.* — 2006. — V. 36, N 2. — P. 122–130.
 32. *Gan Z-R., Li Y., Chen Z. et al.* Identification of basic amino acid residues in thrombin essential for heparin catalyzed inactivation by antithrombin III // *J. Biol. Chem.* — 1994. — V. 269, N 2. — P. 1301–1305.
 33. *Sheehan J. P., Saddler J. E.* Molecular mapping of the heparin-binding exosite of thrombin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1994. — V. 91, N 12. — P. 5518–5522.
 34. *Olson S. T., Bjosle J., Sheffer R., Craig P. A. et al.* Role of the antithrombin-binding pentasaccharide in heparin acceleration of antithrombin-proteinase reactions. Resolution of the antithrombin conformational change contribution to heparin rate enhancement // *J. Biol. Chem.* — 1992. — V. 267, N 18. — P. 12528–12538.
 35. *Tans G., Nicolaes G. A., Thomassen M. C. et al.* Activation of human factor V by meizothrombin // *Ibid.* — 1994. — V. 269, N 23. — P. 15969–15972.
 36. *Di Cera E.* Thrombin: a paradigm for enzymes allosterically activated by monovalent cations // *C. R. Biol.* — 2004. — V. 327, N 12. — P. 1065–1076.
 37. *Di Cera E., Dang Q. D., Ayala Y. M.* Molecular mechanisms of thrombin function // *Cell Mol. Life Sci.* — 1997. — V. 53, N 9. — P. 701–730.
 38. *Wells C. M., Di Cera E.* Thrombin is a Na⁺-activated enzyme // *Biochemistry.* — 1992. — V. 31, N 47. — P. 11721–11730.
 39. *Pineda A. O., Carrel C. J., Bush I. et al.* Molecular dissection of Na⁺ binding to thrombin // *J. Biol. Chem.* — 2004. — V. 279, N 30. — P. 31842–31853.
 40. *Pineda A. O., Sovvides S. N., Waksman G., Di Cera E.* Crystall structure of the anticoagulant slow form of thrombin // *Ibid.* — 2002. — V. 277, N 43. — P. 40177–40180.
 41. *Колодзейская М. В., Волков Г. Л.* Ионы натрия как эфektor каталитического действия α-

- тромбина // Укр. біохім. журн. 2007. — Т. 79, № 1. — С. 5–21.
42. *Huntington J. A.* How Na⁺ activates thrombin — a review of the functional and structural data // *J. Biol. Chem.* — 2008. — V. 389, N 8. — P. 1025–1035.
43. *Prasad S., Cantwell A. M., Bush L. A. et al.* Asp-189 controls both substrate binding and the monovalent cation specificity of thrombin // *Ibid.* — 2004. — V. 279, N 11. — P. 10103–10108.
44. *Carrel C. J., Bush L. A., Mathews F. S., Di Cera E.* High resolution crystal structures of free thrombin in the presence of K (+) reveal the molecular basis of monovalent cation selectivity and an inactive slow form // *Biophys. Chem.* — 2006. — V. 121, N 3. — P. 177–184.
45. *Pineda A. O., Chen Z. W., Bah A. et al.* Crystal structure of thrombin in a self-inhibited conformation // *J. Biol. Chem.* — 2006. — V. 281, N 43. — P. 32922–32928.
46. *Lai M. T., Di Cera E., Shafer J. A.* Kinetic pathway for the slow to fast transition of thrombin // *Ibid.* — 1997. — V. 272, N 48. — P. 30275–30282.
47. *Bah A., Garvey I. C., Ge J., Di Cera E.* Rapid kinetics of Na⁺ binding to thrombin // *Ibid.* — 2006. — V. 281, N 52. — P. 40049–40056.
48. *Anderson P. J., Nasset A., Dharmawardana K. R., Bock P. E.* Characterization of proexosite I on prothrombin // *Ibid.* — 2000. — V. 275, N 22. — P. 16428–16434.
49. *Bock P. E., Olson S. T., Bjork I.* Inactivation of thrombin by antithrombin is accompanied by inactivation of regulatory exosite I // *Ibid.* — 1997. — V. 272, N 32. — P. 19837–19845.
50. *Bukys M. A., Kim P. Y., Nesheim M. E., Kalafatis M.* A control switch for prothrombinase: characterization of a hirudin-like pentapeptide from the COOH terminus of factor Va heavy chain that regulates the rate and pathway for prothrombin activation // *Ibid.* — 2006. — V. 281, N 51. — P. 39194–39204.
51. *Kroh H. K., Tans G., Nicolaes G. A. F. et al.* Expression of allosteric linkage between the sodium ion binding site and exosite I of thrombin during prothrombin activation // *Ibid.* — 2007. — V. 282, N 22. — P. 16095–16104.
52. *Dang O. D., Vindigni A., Di Cera E.* An allosteric switch controls the procoagulant and anticoagulant activities of thrombin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1995. — V. 92, N 13. — P. 5977–5981.
53. *Zhang E., Tulinsky A.* The molecular environment of the Na⁺ binding site of thrombin // *Biophys. Chem.* — 1997. — V. 63, N 2–3. — P. 185–200.
54. *Vijayalakshmi J., Padmanabhan K. P., Mann K. G., Tulinsky A.* The isomorphous structures of prethrombin-2, hirugen- and PPACK-thrombin changes accompanying activation and exosite binding to thrombin // *Protein Sci.* — 1994. — V. 3, N 12. — P. 2254–2271.
55. *Dharmawardana K. R., Olson S. T., Bock P. E.* Role of regulatory exosite I in binding of thrombin to human factor V, factor Va, factor Va subunits, and activation fragments // *J. Biol. Chem.* — 1999. — V. 274, N 26. — P. 18635–18643.
56. *Dharmawardana K. R., Bock P. E.* Demonstration of exosite I — dependent interactions of thrombin with human factor V and factor Va involving the factor Va heavy chain: analyses by affinity chromatography employing a novel method for active-site-selective immobilization of serine proteinases // *Biochemistry.* — 1998. — V. 37, N 38. — P. 13143–13152.
57. *Esmon C. T., Lollar P.* Involvement of thrombin anion-binding exosites 1 and 2 in the activation of Factor V and Factor VIII // *J. Biol. Chem.* — 1996. — V. 271, N 23. — P. 13882–13887.
58. *Myles T., Yun T. H., Hall S. W., Leung L. L.* An extensive interaction interface between thrombin and Factor V is required for Factor V activation // *Ibid.* — 2001. — V. 276, N 27. — P. 25143–25149.
59. *Guinto E. R., Di Cera E.* Large heat capacity change in a protein-monovalent cation interaction // *Biochemistry.* — 1996. — V. 35, N 27. — P. 8800–8804.
60. *Griffon N., Di Stasio E.* Thermodynamics of Na⁺ binding to coagulation serine proteases // *Biophys. Chem.* — 2001. — V. 90, N 1. — P. 89–96.
61. *Rezaie A. R., He X.* Sodium binding site of Factor Xa: role of sodium in the prothrombinase complex // *Biochemistry.* — 2000. — V. 39, N 7. — P. 1817–1825.
62. *Papaconstantinou M. E., Gandhi P. S., Chen Z. et al.* Na⁺ binding to meizothrombin des F1 // *Cell. Mol. Life Sci.* — 2008. — V. 65, N 22. — P. 3688–3697.
63. *Cote H. C. F., Stevens W. K., Bajzar L. et al.* Characterization of stable form of human meizothrombin derived from recombinant prothrombin (R155A, R271A, and R284A) // *J. Biol. Chem.* — 1994. — V. 269, N 15. — P. 11374–11380.
64. *Cote H. C. F., Bajzar L., Stevens W. K. et al.* Functional characterization of recombinant human meizothrombin and meizothrombin (desF1). Thrombomodulin-dependent activation of protein C and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI), platelet aggregation, antithrombin-III inhibition // *Ibid.* — 1997. — V. 272, N 10. — P. 6194–6200.
65. *Tans G., Nicolaes G. A., Thomassen M. C. et al.* Activation of human factor V by meizothrombin // *Ibid.* — 1994. — V. 269, N 23. — P. 15969–15972.
66. *Корольова Д. С., Чернищенко В. О., Горницька О. В., Платонова Т. М.* Вплив продуктів розщеплення протромбіну на активацію та агрегацію тромбоцитів // *Укр. біохім. журн.* — 2009. — Т. 81, № 5. — С. 58–65.

**МЕЗОТРОМБІН — ПОХІДНЕ
ПРОТРОМБІНУ — Na⁺-ЗАЛЕЖНИЙ
АЛОСТЕРИЧНИЙ ЕНЗИМ**

*М. В. Колодзейська
О. І. Юсова
Т. В. Гриненко*

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

E-mail: yusova07@mail.ru

Сучасний механізм активації протромбіну передбачає, що проензим і його активний інтермедіат мезотромбін існують в альтернативних конформаціях, які визначають послідовне розщеплення двох пептидних зв'язків у молекулі протромбіну, необхідних для його перетворення на тромбін. Конформація протромбіну є оптимальною для розщеплення зв'язку Arg 320-Ile 321, тоді як мезотромбіну — Arg 271-Thr 272.

Мезотромбін, на відміну від тромбіну, майже не виявляє прокоагулянтних властивостей, проте має підвищену антикоагулянтну активність, опосередковану тромбомодулінзалежною активацією протеїну С. Мезотромбін може регулювати фібринолітичний процес через тромбомодулінзалежну активацію інгібітора фібринолізу (TAFI).

Мезотромбін, як і тромбін, взаємодіє з фібриногеном, тромбомодуліном і протеїном С. Його специфічність залежить від зв'язування іонів натрію. Виявлено, що своєрідні прокоагулянтні властивості мезотромбіну — активація факторів V і VIII на мембранах та протикоагулянтні, зумовлені активацією зв'язаного з тромбомодуліном протеїну С, регулюються Na⁺ як ефектором його каталітичної функції. Крім того, Na⁺ впливає на активність мезотромбіну, збільшуючи афінність лігандів до екзосайту I і спрямовуючи активацію протромбіну на утворення тромбіну безпосередньо зі швидкої форми мезотромбіну. Визначення мезотромбіну як Na⁺-залежного алостеричного ензиму розкриває нові підходи для регуляції його активності та специфічності дії.

Ключові слова: протромбін, мезотромбін, фактор V зсідання крові, екзосайти I і II тромбіну, зв'язування Na⁺, алостерична регуляція.

**MEIZOTHROMBIN, NAMELY A DERIVATE
OF PROTHROMBIN, IS A Na⁺-DEPENDENT
ALLOSTERIC ENZYME**

*M. V. Kolodzeiskaia
E. I. Yusova
T. V. Grinenko*

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

E-mail: yusova07@mail.ru

According to modern conception concerning the mechanism of prothrombin activation, proenzyme and its intermediate form, meizothrombin exist in alternative conformations. The last ones determine splitting of two peptide bonds in the prothrombin molecule, that is necessary for its transformation into thrombin. Prothrombin conformation is optimal to split the bond Arg 320-Ile 321, while meizothrombin conformation is the most suitable to split Arg 271-Thr 272.

In contrast to thrombin, meizothrombin has ill-defined procoagulant properties and enhanced anticoagulant activity mediated by thrombomodulin-dependent activation of protein C. Meizothrombin can regulate fibrinolytic process through thrombomodulin-dependent activation of fibrinolysis inhibitor (TAFI)

Similar to thrombin, meizothrombin interacts with fibrinogen, thrombomodulin and protein C. Meizothrombin specificity depends on binding of sodium ions. It was found that specific procoagulant properties of meizothrombin (such as activation of factors V and VIII on the membrane surface) and anticoagulant ones, which are induced by the activation of protein C bound with thrombomodulin, can be regulated by Na⁺ as an effector of its catalytic function. Besides, Na⁺ influences on the meizothrombin activity by increasing affinity of ligands towards exosite I and by guidance of prothrombin activation, that leads to thrombin formation directly from the fast form of meizothrombin. Discovery of meizothrombin as Na⁺-dependent allosteric enzyme can reveal new approaches for regulation its activity and specificity.

Key words: prothrombin, meizothrombin, coagulation factor V, thrombin exosites I and II, Na⁺ binding, allosteric regulation.

ФОТОБІОРЕАКТОРИ

Ю. І. СИДОРОВ

Національний університет «Львівська політехніка», Львів

E-mail: sydorowy@rambler.ru



Розглянуто сучасний стан конструювання лабораторних, пілотних і промислових фотобіореакторів (ФБР). Показано еволюцію конструкцій лабораторних ФБР — від чашки Петрі, пробірки або колби, від плоских конструкцій, що освітлюються ззовні, до середовищ, що містять світлодіоди. Зазначено, що можливість штучного вирощування деяких видів водоростей з високим вмістом ліпідів, з яких можна одержувати так званий біодизель, надала поштовху розвитку промислових ФБР, які також пройшли еволюційний шлях від відкритих теплих водоймищ до закритих ємнісних і трубчастих конструкцій. Вважають, що масове виробництво водоростевого біодизеля може швидко вирішити енергетичні проблеми України, але досягнений на сьогодні світовий рівень продуктивності існуючої промислової апаратури й наведені у статті прості економічні розрахунки не дають підстави стверджувати, що в найближчому майбутньому водоростеве біодизельне паливо може кардинально вирішити енергетичні проблеми нашої країни.

Ключові слова: фотобіореактор, конструкція, водоростеве біодизельне паливо.

Сьогодні найважливішими галузями біотехнологічного застосування фотобіореакторів (ФБР) вважають культивування хлорели і спіруліни — цінне джерело протеїну; ставкової твані *Clamidomonas reinhardtii* і пурпурних бактерій *Rhododacter capsulatus*, що здатні продукувати ензим гідрогеназу, за допомогою якого можна одержати енергетичний водень; галобактерій — продуцентів бактеріородопсину, з яким пов'язують розвиток систем зберігання інформації нового типу, голографічних інтерферометрів, надшвидких детекторів світла, а також створення штучного ока; одержання надчисотого і дешевого кремнезему для мікроелектроніки, комплексу поліненасичених жирних кислот з діатомітових водоростей *Synedra acus* тощо.

Однак найактуальнішою біотехнологічною галуззю використання фотобіореакторів є одержання біодизельного палива із синьо-зелених водоростей. Особливістю деяких видів водоростей, що перебувають у певних стресових умовах, є здатність накопичувати велику кількість ліпідів (до 80% у перерахунку на суху масу). До того ж мікрородості — рослини, що найбільш швидко розмножуються. За належного догляду їхня маса збільшується вдвічі всього за 40 год.

Ці феномени і спонукали звернути особливу увагу на синьо-зелені водорості як джерела вуглеводнів, з яких можна виробляти

дизельне паливо. Крім ліпідів, сучасні генно-модифіковані водорості здатні продукувати гелеподібну субстанцію, багату на целюлозу, яку можна легко переробити на біопаливний етанол. Підраховано, що «врожайність» водоростей за паливом перевищує таку будь-яких рослинних культур: мінімум у 3 рази (пальмова олія), максимум у 100 разів (кукурудза).

З 50-х років минулого сторіччя біопаливний потенціал водоростей є об'єктом пильної уваги вчених Франції, Німеччини, Японії і США. У США з 1978 до 1996 р. діяла пошукова наукова програма Aquatic Species Program (ASP), що її реалізувала Національна лабораторія США з відновлюваної енергії — NREL (US National Renewable Energy Laboratory) [1]. 2006 р. декілька компаній повідомили про будівництво заводів з виробництва біодизеля з водоростей: Global Green Solutions (Канада) за технологією компанії Valcent Products (США) — потужність 4 млн. барелей біонафти на рік; Bio Fuel Systems (Іспанія); De Beers Fuel Limited (ЮАР) за технологією Greenfuel Technologies Corporation (США) — потужність виробництва 900 млн. галонів біодизеля на рік (водорості + соняшникова олія); Aquaflow Bionomic Corporation (Нова Зеландія) — потужність виробництва 1 млн. л біодизеля на рік. Інвестиційна фундація Cascade Investment, що існує за рахунок капіталу Білла Гейтса,

заснувала компанію Sapphire Energy, яка займатиметься переробленням морських водоростей на автомобільне паливо. Компанія вже одержала 100 млн. дол. на створення переробного заводу потужністю 10 тис. барелей біопалива за добу. На водоростевий біодизель звертають увагу авіакомпанії, які вбачають у новій технології можливість незалежності авіатранспорту від наявності нафти. Так, наприклад, напівпромисловими установками з виробництва нового біопалива обладнано аеропорт ім. Дж. Леннона в Лондоні, активно освоює водоростеву технологію й авіакомпанія KLM Airlines.

В Україні також виявляють неабиякий інтерес до водоростевих технологій. Зокрема, ГНПК «Київський інститут автоматики» вже робить кроки у напрямі налагодження виробництва біопалива зазначеного типу. Компанія ТОВ «БІОДИЗЕЛЬДНЕПР» також пропонує високотехнологічну автоматичну лінію із замкнутим циклом. У Національному університеті харчових технологій спільно з Інститутом біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України розроблено власну установку на базі вертикального трубчастого ФБР, який дозволяє інтенсифікувати процеси біосинтезу водоростей. З Дніпропетровська в Донецький інноваційний центр вже надійшла заявка на впровадження нової технології одержання олії з водоростей [2].

Отже, є підстави вважати, що незабаром можна очікувати бурхливого впровадження новітньої енергетичної технології, яка деякою мірою сприятиме вирішенню енергетичних проблем України. Про наукові й технічні подробиці технології фотобіосинтезу можна довідатися з багатьох джерел інформації, зокрема з [1], але для реалізації усіх зазначених наукових і промислових програм потрібно мати обладнання, відомості про яке недостатні або малодоступні [3–7]. Саме тому інформація про існуючі ФБР є вкрай актуальною.

Лабораторні ФБР

Найпростіший ФБР — освітлювана чашка Петрі, пробірка або колба (рис. 1). Однак у такій системі існує так званий «ефект дози», який виникає за нерівномірного освітлення окремих об'єктів; отже, зіставлення одержаних результатів є неможливим.

Проблеми ставали дедалі гострішими з переходом на напівпромисловий і промисловий рівні отримання цільових продуктів у світлозалежних технологічних процесах.

Почалась ера розроблення апаратів для культивування фотосинтезуючих мікроорганізмів, що дістали назву фотобіореактори.

Традиційним методом конструктивного вирішення цих завдань є використання робочих емностей апаратів, виготовлених із прозорих матеріалів з розташуванням необхідної кількості джерел світла ззовні. У таких випадках перемішування і аерацію культури проводять традиційними способами (рис. 1, а). Дотепер використовують також різноманітні плоскі конструкції (рис. 1, б).



а



б

Рис. 1. Прості лабораторні ФБР ємнісного типу:
а — з традиційною колбою;
б — з плоскою ємністю

Серед нових комп'ютеризованих моделей ФБР слід відзначити ферментер BIOSTAT PBR 2 S (фірма Sartorius) (рис. 2). Його робочий об'єм — 1,9 дм³, площа фотосинтетичного модуля — 0,4 м². Фірма випускає також пілотні ФБР. Модельний ряд пілотних ФБР складається з біореакторів різних розмірів. Усі ферментери розроблено відповідно до GMP-вимог.

Загальний об'єм пілотного ФБР BIOSTAT PBR 100 AS становить 100 дм³. Для зменшення площі, яку займає реактор, його по-

будовано за вертикальною схемою. Рух рідини в цій моделі забезпечує система air-lift. У верхній частині потоки зі всіх труб змішуються, забезпечуючи насичення газом. Інтенсивність світла може змінюватися відповідно до вимірюваної оптичної густини культури. Площа модуля фотосинтезу — 4,6 м². Габарити (мм): 1120×1120×3600.



Рис. 2. ФБР BIOSTAT PBR 2 AS

Російська фірма «Проинтех» (м. Пуціно, РФ) також випускає лабораторні ФБР (рис. 3).

Розроблено багато конструкцій апаратів із джерелами світла, які розташовані безпосередньо усередині робочих ємностей. У цих ФБР вертикальні трубчасті лампи штучного світла встановлені в робочу ємність і додатково слугують відбивними перегородками. Як приклад конструкції, що її ефективно використовують, можна навести вітчизняний апарат, захищений авторським свідоцтвом SU 1570678 A1 (1979) [8]. Звичайні лопатеві мішалки забезпечують високу кратність оновлення освітленого шару суспензії за рахунок збільшення числа Рейнольдса в рідині, що переміщується, внаслідок чого режим течії з ламінарного стає турбулентним.



Рис. 3. Лабораторний ФБР фірми «Проинтех»

Наступний стрибок в еволюції ФБР пов'язаний з появою світлодіодів та їхніми широкими потенційними можливостями. Очевидно, що світлодіоди є реальною альтернативою традиційним джерелам світла, у тому числі й для перенесення світлової енергії до клітин мікроорганізмів у процесі їх культивування. Освітлювальні пристрої на базі світлодіодів мають унікальні технологічні переваги. Їхній розмір становить лише декілька міліметрів; типовий світлодіод споживає постійний струм силою 15–20 мА за робочої напруги близько декілька вольт.

За останні роки ефективність світлодіодів істотно зросла: у грудні 2006 р. фірма Nichia анонсувала нові світлодіоди білого свічення з ефективністю світловидатності 150 лм/Вт. У ламп розжарювання цей показник на порядок нижче і становить 10–15 лм/Вт, у люмінесцентних ламп — 90 лм/Вт. Навіть у кращих за ефективністю серед традиційних джерел світла натрієвих ламп високого тиску максимальна світловидатність — близько 130 лм/Вт.

Монохроматичне випромінювання світлодіодів сприяє високій насиченості кольору, коефіцієнт кольоропередачі Ra у білих світлодіодів перевищує 80 (в ідеального світильника, що повністю імітує сонячний спектр, Ra = 100, у галогенових і кращих зразків люмінесцентних ламп Ra > 90) [8].

Проривом у конструюванні ФБР стало також розроблення вітчизняного апарата — SU 1828660 A3 (1981) [8], призначеного для

вирощування водорості з ніжними клітинними стінками — спіруліни. Принципова відмінність апарата, розробленого під керівництвом В. А. Жаворонкова (МДУ, РФ), полягає у використанні гнучких мішалок, закріплених між двома горизонтально розташованими дисками (рис. 4).

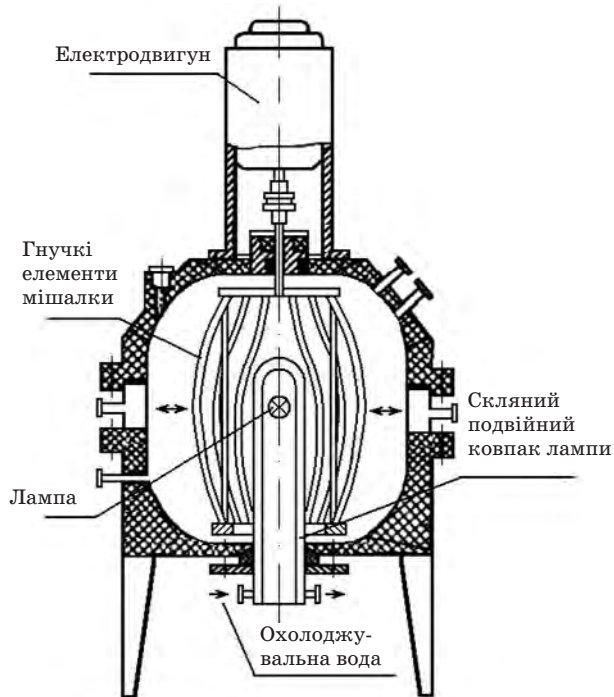


Рис. 4. Принципова схема і зовнішній вигляд ФБР Жаворонкова з гнучкими лопатями об'ємом 2,5 дм³

Обертання такого перемішувального пристрою забезпечує утворення повітряної порожнини в центрі ємності апарата за рахунок посилення відцентрового переміщення культуральної рідини. У цій порожнині розташовують електричні лампи, укладені в світлопрозорий двостінний кожух. У порожнині між подвійними стінками циркулює рідина, яка слугує холодоагентом для потужних натрієвих ламп. На сьогодні в МДУ створено серію ФБР цієї конструкції об'ємом до 100 дм³.

Пілотні ФБР

На рис. 5 показано пілотне обладнання, на якому навчались вирощувати спіруліну в Інституті біології південних морів ім. О. О. Ковалевського НАН України (ІБПМ).



Рис. 5. Пілотна установка ІБПМ

Промислові установки з виробництва біомаси з хлорели, яку використовують як корм для худоби, мають вигляд системи неглибоких і не дуже великих за площею басейнів під скляною покрівлею, а іноді — під відкритим небом (залежно від кліматичних умов).

Так, протягом 6 років водорості вирощували у ставках площею до 1 000 м². Ставок у Нью-Мехіко має високу ефективність в захопленні CO₂. Врожайність становила більше 50 г водоростей з 1 м² на добу. 200 тис. га ставків можуть продукувати паливо, достатнє для річного споживання 5% автомобілів США (рис. 6).

Однак відкриті басейни не забезпечують алголічної чистоти культури: в суспензії водоростей в значній кількості містяться не лише механічні (порох), але й біологічні (інфузорії, водорості інших родів тощо)

домішки. У зв'язку з цим було сформульовано першу основну вимогу до промислових установок з культивування водоростей — наявність культиватора закритого типу.



Рис. 6. Відкритий ставок для промислового вирощування водоростей

Другою основною умовою при розробленні установок для промислового культивування водоростей є забезпечення терморегулювання суспензії в межах, що є оптимальними для використовуваного штаму. Ця вимога зумовлена значними коливаннями температури повітря протягом року і доби та неможливістю у зв'язку з цим забезпечити достатньо високу й рівномірну продуктивність культури.

Саме такою була напівпромислова трубчаста установка закритого типу для виробництва «кремлівських таблеток» (рис. 7) з освітленням потужними натрієвими лампами (рис. 8).

Сьогодні провідною в Європі фірмою з виробництва фотобіореакторів є компанія AEN Engineering GmbH & Co (м. Диленбург, Німеччина). На рис. 9–11 показано зовнішній вигляд і схеми лабораторно-пілотного трубчастого ФБР цієї фірми PBR 25 G.

Зрозуміло, що джерелом світла для промислових багатотоннажних ФБР з виробництва водоростевого біодизеля має бути сонце, а не натрієві лампи чи світлодіоди.

З того часу, як виникли пілотні ФБР, дотепер використовують «мобільні ФБР», змонтовані на вантажівках і призначені для пересування з метою виявлення місць, що забезпечують якнайкращий режим інсоляції і, отже, максимальну біологічну продуктивність (рис. 12).

Напівпромислові пілотні установки із сонячним освітленням застосовує російське підприємство «Екологическая группа» (Калінінград) (рис. 13).



Рис. 7. Перший радянський напівпромисловий трубчастий ФБР для вирощування спіруліни, з якої виробляли «кремлівські таблетки»



Рис. 8. Трубчастий ФБР зі штучним освітленням потужними натрієвими лампами



Рис. 9. Зовнішній вигляд PBR 25 G

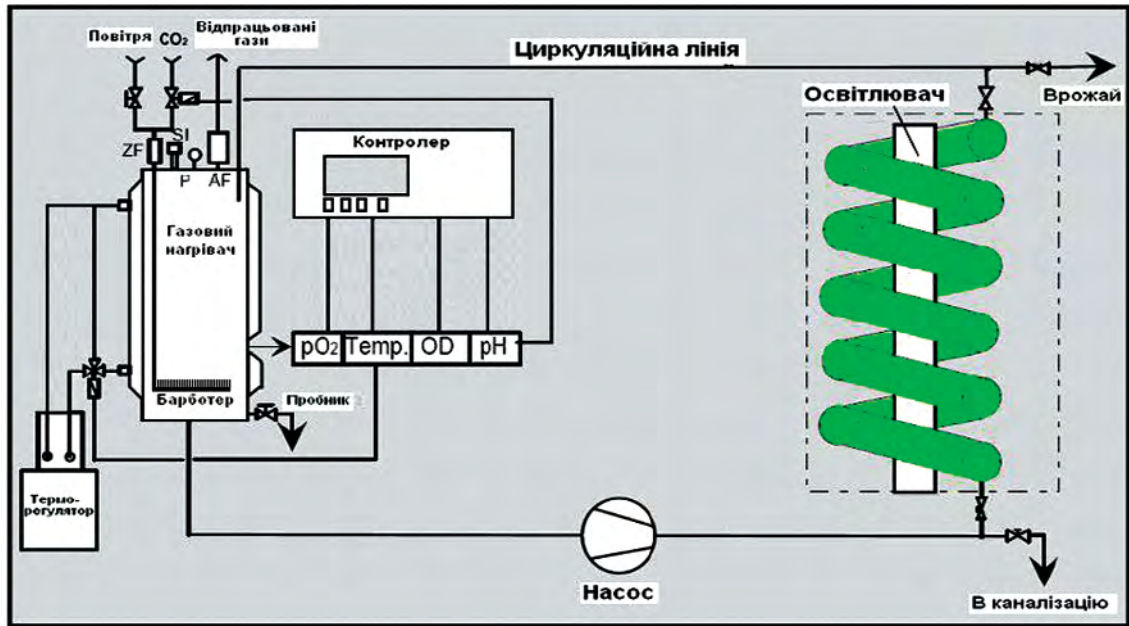


Рис. 10. Принципова схема PBR 25 G

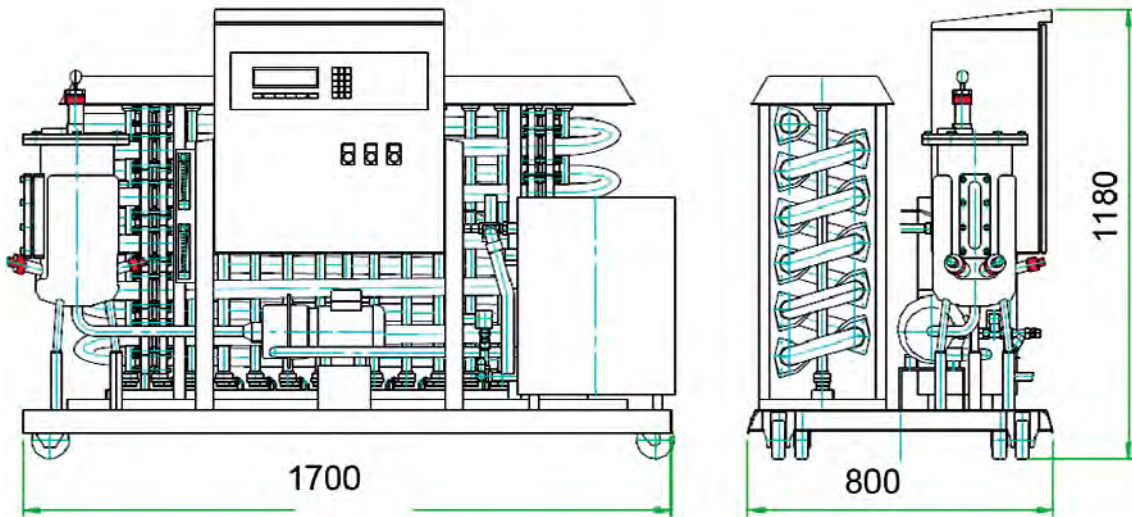


Рис. 11. Монтажна схема PBR 25 G



Рис. 12. Пілотно-промисловий ФБР колбового типу періодичної дії (Аризона, США)

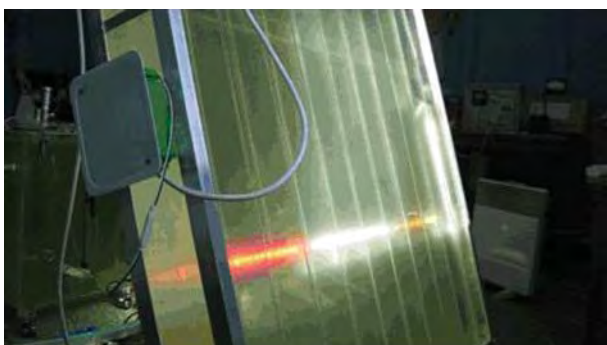


Рис. 13. Пілотна установка проточно-площинного типу об'ємом 210 дм³ підприємства «ЭГ». Установка розрахована на підгодівлю спіруліною 70 телят

За таким способом вирощують спіруліну і в київській компанії ЗАТ НВФ «Біоспіруліна».

Отже, світова промисловість випускає достатньо широку номенклатуру лабораторних і пілотних реакторів для дослідницьких цілей. Перевагу потрібно надавати сучасній апаратурі, яка йде в комплекті з комп'ютерами.

Промислові ФБР

При проектуванні промислового фотоавтотрофного культиватора за умов сонячного освітлення до уваги беруть такі технічні й біологічні умови: на початку і наприкінці світлового дня інтенсивність сонячної радіації різко падає, причому висота сонця над горизонтом у цей час мінімальна і освітленість горизонтальної поверхні значно менша, ніж вертикальної. Тому наявність у ФБР вертикально розташованої поверхні може значно збільшити продуктивність культиватора за рахунок більш ефективного використання світлової енергії сонця в ранкові та вечірні години.

З урахуванням зазначених чинників з'явилась велика кількість варіантів промислових ФБР закритого типу: плоскі вертикальні і нахилені з можливістю міняти кут нахилу залежно від положення сонця протягом доби, конусоподібні (рис. 14) і конусоподібні з додатковими вертикальними поверхнями (типу «юрти»), трубчасті, періодичного і безперервного типів тощо.

Безперервні ФБР мають системи терморегулювання і переміщення. Переміщення, як правило, є циркуляційного типу: суспензію відцентровим насосом або ерліфтом подавали наверх установки, звідки вона стікає робочими поверхнями і збирається внизу в збірнику.

На рис. 15 показано ФБР періодичної дії, яка по суті є водоймищем, але закритого типу.



Рис. 14. Конусоподібні ФБР



Рис. 15. Промисловий ФБР періодичної дії (США)

Окрім пілотних, компанія AEN Engineering GmbH & Co випускає також промислові ФБР трубчастого типу об'ємом 42 і 85 м³. На рис. 16–18 показано зовнішній вигляд, принципову і монтажну схему промислового ФБР моделі PBR 42000 G.



Рис. 16. Зовнішній вигляд промислового ФБР PBR 25 G

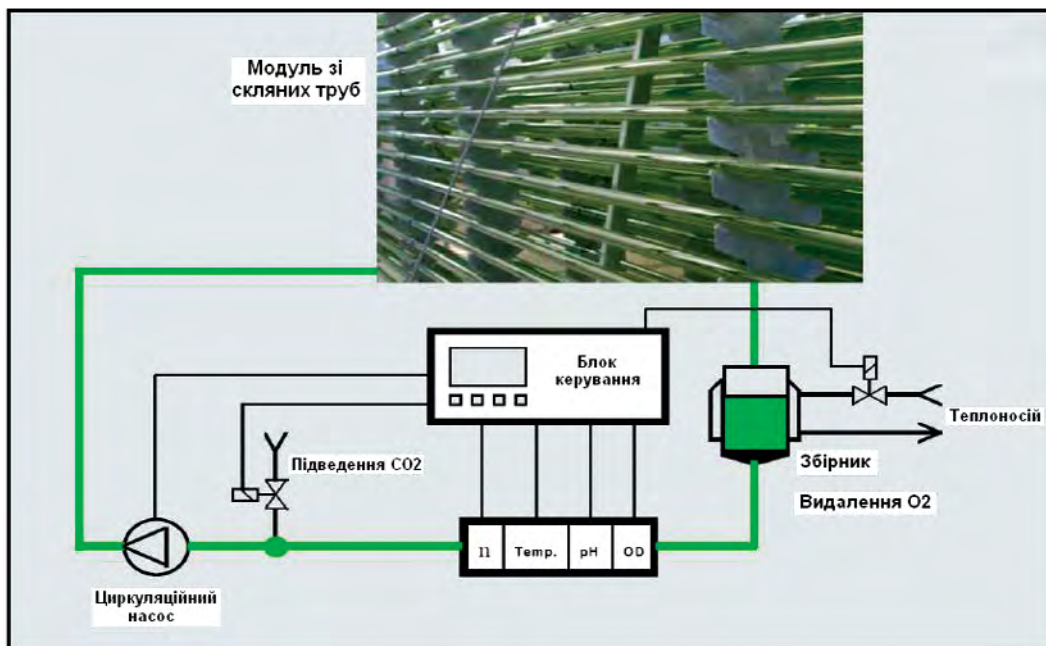


Рис. 17. Принципова схема PBR 42000 G

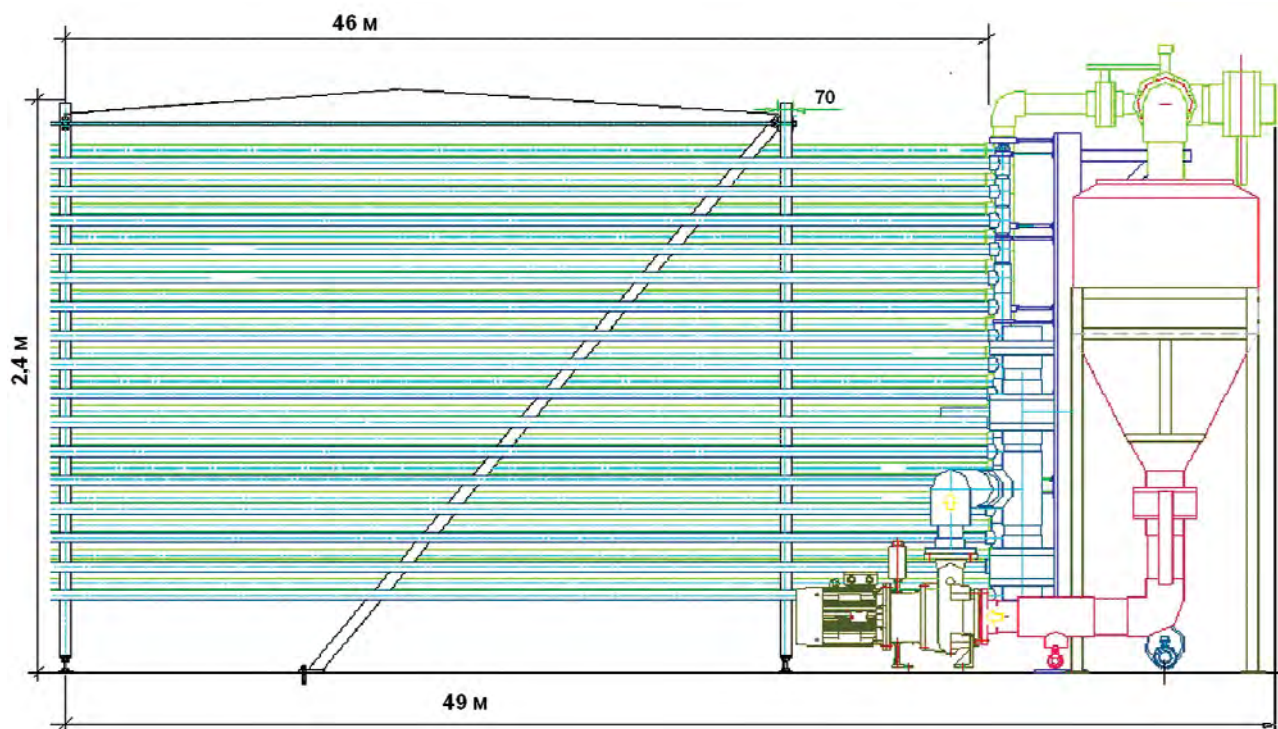


Рис. 18. Монтажна схема PBR 42000 G

Для одержання чистої водоростевої монокультури, яка необхідна для запуску робочого ФБР або для використання її у фармацевтичній, косметичній та харчовій промисловості фірма AEN застосовує так звану AlgaForce Technology. На рис. 19 показано приміщення і колбові ФБР для одержання чистої культури.

Цією самою фірмою розроблено також технологію під назвою DiaForce, яка імітує природні умови розвитку водоростевих полікультур, зокрема наявність водограїв, що забезпечують високі гідродинамічні характеристики системи та інтенсивне перемішування й насичення середовища повітрям і CO_2 , що міститься в ньому. В кінцевому підсумку це дає змогу прискорити ріст біомаси (рис. 20, 21).



Рис. 19. Установка для одержання водоростевої монокультури за AlgaForce Technology



Рис. 20. Установка для вирощування водоростевих полікультур за технологією DiaForce

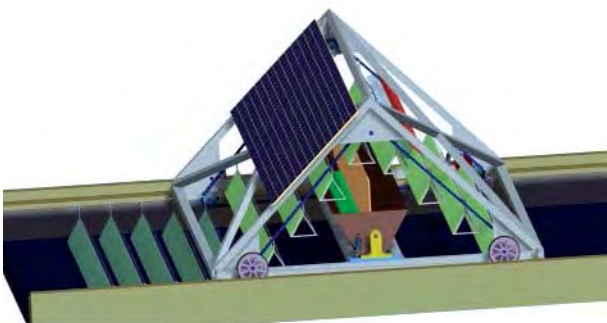


Рис. 21. Головний елемент системи DiaForce

Продукти, які одержують за технологією DiaForce, використовують як кормові добавки у тваринництві, для виготовлення косметичних засобів, біогазу, біопалива.

Слід зауважити, що технології DiaForce притаманні всі недоліки відкритих ФБР. Крім того, практика показала, що одноклітинні водорості, якщо застосовувати їх у сирому (живому) вигляді, руйнують систему травлення ссавців. На сьогодні в цивілізованих країнах заборонено годувати одноклітинними водоростями тварин і птиць, якщо їхнє м'ясо людина споживає в їжу [9].

Окрім світла, для росту фотоавтотрофних водоростей потрібен і CO_2 . Для більшості розроблених ФБР джерелом діоксиду вуглецю є повітря, яке містить цей газ у значній кількості. Утім, цим джерелом можуть бути й промислові газові викиди від електростанцій, металургійних заводів, спиртозаводів, біотехнологічних підприємств тощо.

Технологія корпорації GreenFuel Technologies з Массачусетського технологічного інституту Emissions-to-Biofuels унікальна за своєю здатністю знижувати викиди вуглекислого газу у вигляді нового палива. Тимчасом як багато передових заводів і електростанцій розробляють проекти поховання парникового газу, викиди якого в сучасному світі є предметом торгівлі і квотування, американська компанія пропонує перетворювати незручні відходи на доходи, зокрема на паливо. Винайшов цей метод і заснував компанію GreenFuel Technologies Ісаак Берзін (Isaac Berzin).

На дослідній промисловій установці, що працює в Аризоні, викид теплової електростанції перетворюється на біодизельне паливо (рис. 22). Крім того, тепло, що його скидає ТЕЦ, здатне покривати до 77 % потреб у теплі, яке необхідне для вирощування водоростей.

Схему технологічного циклу Emissions-to-Biofuels подано на рис. 23 [10].

Через колби ФБР, що містять, окрім водоростей і води, постійно додають поживні речовини (сільськогосподарські відходи), пропускають димовий газ — безпосередньо зі станційної труби. Далі цю суміш пропускають через первинну сушарку, яка відділяє воду і спрямовує її назад у ФБР. Одержана висококонцентрована суспензія водоростей (тут їх концентрація в 10–30 разів вища, ніж у ФБР) надходить у наступну секцію установки для одержання біодизеля, бензину, протеїнової біомаси.



Рис. 22. ФБР у комплексі з ТЕЦ

Зауважимо, що подібні схеми розроблені й з успіхом застосовуються і в Росії [11]. На рис. 24 наведено гібридну блок-схему використання тепла і CO_2 московської теплової електростанції «Біосоляр – ТЕЦ-26». Одержане паливе знову використовують як паливо для цієї самої ТЕЦ.

Принциповим у цій схемі є те, що після дезінтеграції і сепарації біомаси біогенні речовини — фосфор, калій, азот тощо — повертаються в культуральне середовище для повторного вирощування мікродоростей. Схема є замкненою за всіма біогенними елементами окрім вуглецю.

Хоча успіхи в розробленні промислових ФБР є очевидними, до появи цілої галузі енергетичних підприємств для заміни нафтових вуглеводнів далеко — потужні промислові ФБР ще не створено. За даними АЕН, сьогодні жодна фірма не випускає ФБР з продуктивністю 20, 50 або 100 т сухої біомаси за добу; максимальна продуктивність існуючих ФБР для виробництва водоростевого біодизеля становить 10–15 т/добу.

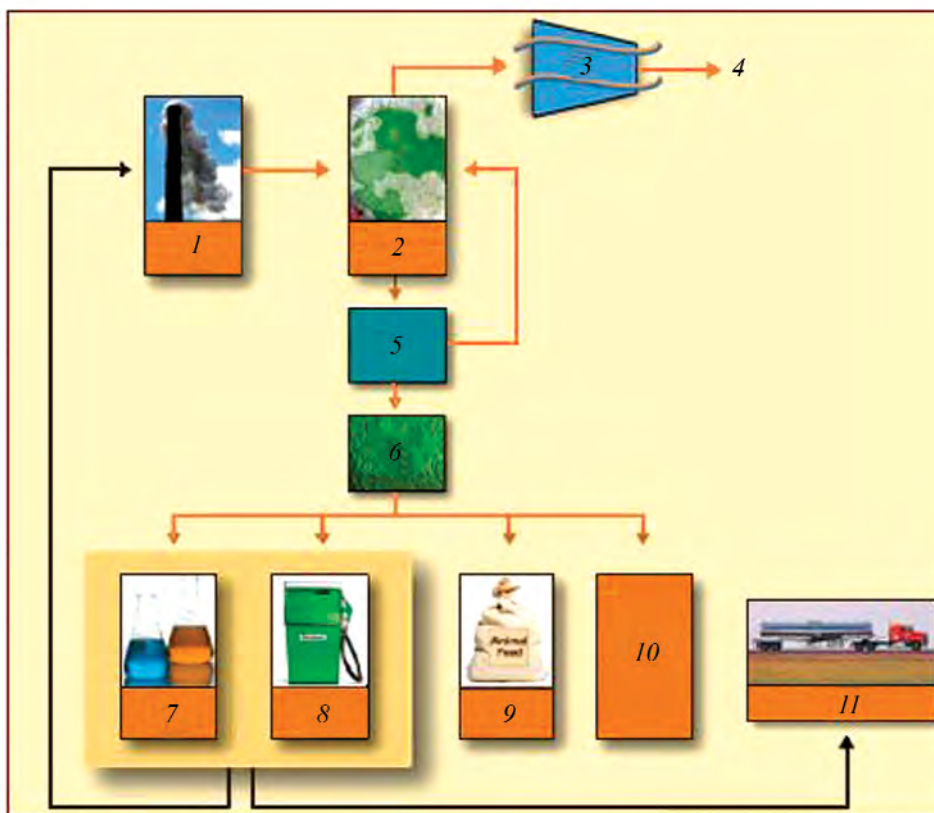


Рис. 23. Схема технологічного циклу Emissions-to-Biofuels:

1 — димові гази теплової електростанції; 2 — біореактор з водоростями; 3 — вентилятор; 4 — вихід кисню й азоту; 5 — первинне сушіння (стрілка в напрямі до реактора — рециклінг води); 6 — біомаса; 7 — етанол, метанол; 8 — біодизель; 9 — протеїновий концентрат; 10 — інші продукти; 11 — автомобільне паливо (стрілка в напрямі від спиртів і біодизеля до зображення теплової станції означає, що ці продукти можна не тільки продавати автомобілістам, але й використовувати для вироблення електрики на місці виробництва, ілюстрація GreenFuel Technologies)

Умовно приймемо, що в Україні всю імпортовану нафту (37,9–42,9 млн. т/рік) буде замінено водоростевим біодизелем протягом п'яти років. З добового «врожаю» сухої біомаси реально за добу з найпотужнішого на сьогодні ФБР можна одержати 6 т дизельного палива, а за рік — у середньому 2 200 т. Щорічно Україна імпортує 37,9–42,9 млн. т сирої нафти, з якої одержують приблизно 30 млн. т світлих нафтопродуктів. Отже, для покриття дефіциту водоростевим біодизелем потрібно закупити $30\,000\,000 / 2\,200 = 13\,636$ установок (!), вартість яких 0,53 млн. дол. за кожну. Отже, треба знайти 7,2 млрд. дол. на закупівлю установок і ще третину від цієї суми витратити на транспортування, монтаж і запуск обладнання, ще половину — на будівельні роботи і створення інфраструктури. Якщо ж врахувати інфляцію (6%), то за 5 років впровадження технології потрібно витратити ~15 млрд. дол. Насправді ж ця сума буде ще більшою, оскільки, за даними АЕН, ціна повномасштабної установки продуктивністю 100 т сухої біомаси за добу становитиме 10 млн. дол. Установки вітчизняної фірми «Біодизель-Днепр» за розрахунками розробників будуть значно дешевшими — 4,5 млн.

грн (0,56 млн. дол.) за продуктивності 38 т сухої біомаси за добу [12] (тобто в 10 разів менше, що викликає сумнів), але і в цьому разі капіталовкладення становитимуть мільярди доларів. Слід взяти до уваги, що для тризмінного обслуговування однієї установки потрібен штат не менше 15–20 працівників, тобто для обслуговування 5–13 тис. установок необхідно задіяти 75–260 тис. робітників та ІТР. Зауважимо також, що для обслуговування всіх шести нафтопереробних заводів України задіяно не більше 3–7 тис. працівників. Якщо ж є наміри замінити й імпортний природний газ, то всі цифри потрібно збільшити ще в 2,6 раза.

Найімовірніше, водоростевий біодизель буде становити невелику, хоча й важливу частку в українській енергетиці, а основним джерелом енергії на найближчі десятиріччя залишатимуться природний газ, нафтові вуглеводні, вугілля, гідроенергія та ядерне паливо.

Автор висловлює подяку представникові фірми АЕН в Україні і Росії Анатолію Юшину за надані фотоматеріали та допомогу в підготовці статті.

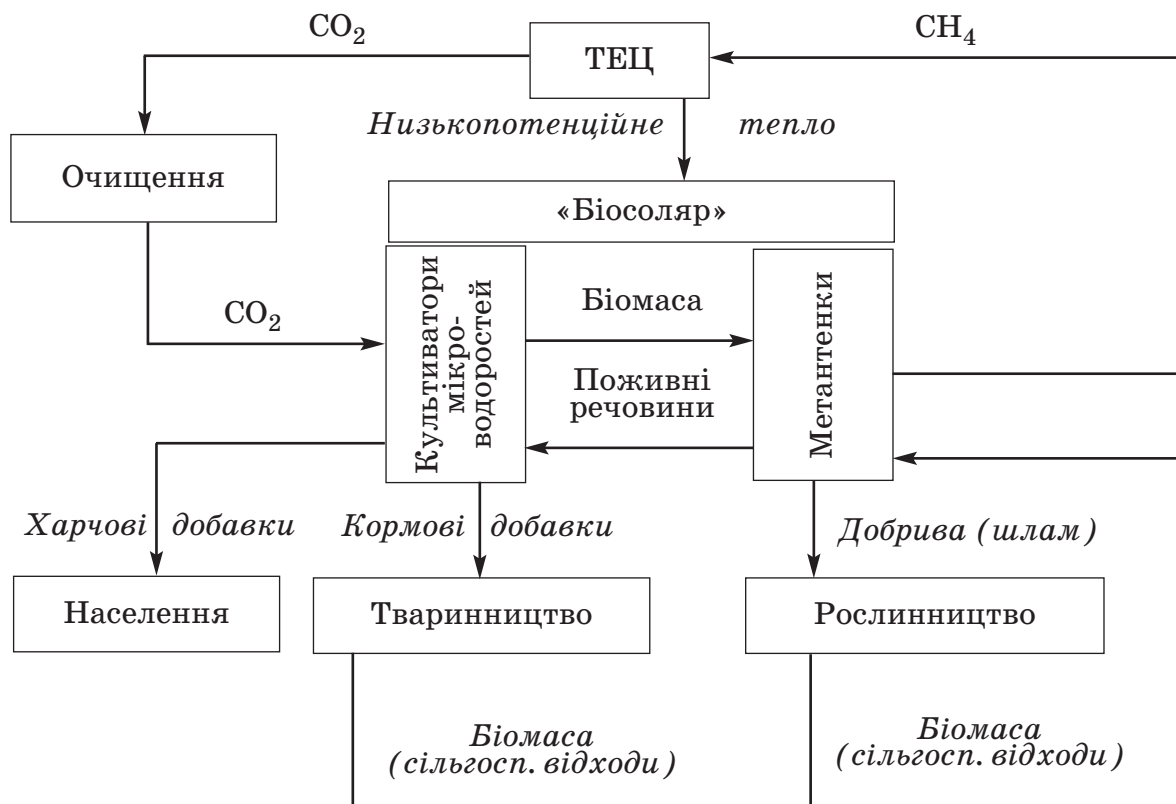


Рис. 24. Схема гібридної енергосистеми «Біосоляр — ТЕЦ-26»

БІОФОРТИФІКАЦІЯ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ РОСЛИН

О. М. БУРЛАКА, Б. В. СОРОЧИНСЬКИЙ

Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України, Київ

E-mail: burlaka29@gmail.com

Обговорюється проблема біофортificaції, яка передбачає поліпшення методами біотехнології поживних властивостей сортів сільськогосподарських рослин. Розглянуто питання харчового дефіциту деяких мінералів та вітамінів і негативних наслідків цього для здоров'я населення, які можна зменшити, створюючи та використовуючи рослинні продукти з покращеними властивостями. Описано напрями та досягнення підвищення харчової цінності рослин із застосуванням методів генетичної інженерії.

Ключові слова: біофортificaція, дефіцит мікронутрієнтів, генетична інженерія, поліпшення властивостей рослин.

Термін «біофортificaція» означає поліпшення поживних якостей рослин шляхом використання прийомів традиційної селекції або ж завдяки генно-інженерним підходам. Суть біофортificaції — у зміні властивостей самої рослини, і саме в цьому її відмінність від фортificaції харчової продукції, яка передбачає цілеспрямоване внесення додаткових мікронутрієнтів та вітамінів у харчові продукти з метою поліпшення їхньої поживної цінності. Кінцевою метою стратегії біофортificaції є створення рослин з підвищеним рівнем вмісту певних елементів та сполук — як таких, що поглинаються з ґрунту (макро- та мікроелементи), так і тих, що синтезуються в рослині (вітаміни, вторинні метаболіти). Завдяки сучасним генно-інженерним технологіям, реальними стали також синтез та накопичення у певних частинах рослини не властивих їй сполук (наприклад, збагачення бета-каротином ендосперму золотого рису) з метою надання окремим культурам нових поліпшених властивостей для забезпечення поживної цінності харчового раціону.

Проблема якісного та збалансованого харчування є глобальною. Вкрай актуальна вона також і для України. За даними ВООЗ, причиною 0,8 млн. смертей на рік (1,5% від загальної кількості) є дефіцит заліза і такої самої кількості — дефіцит вітаміну А [1]. Загалом, близько 25% населення світу (майже 1,6 млрд. людей) страждають від анемії різного походження [2], половина цих випадків спричинена дефіцитом заліза. Окрім цього припускають існування ще близько

1 млрд. випадків дефіциту заліза без анемії [3]. 254 млн. дітей дошкільного віку в світі мають дефіцит вітаміну А, у 3 млн. з них спостерігаються видимі зміни зорового апарату внаслідок цього дефіциту, а 250–500 тис. дітей сліпнуть щороку через дефіцит вітаміну А, половина з них помирає протягом місяця після цього [4]. Близько 2 млрд. людей (30% усього населення), за оцінками ВООЗ, споживають недостатньо йоду і перебувають під загрозою йододефіцитних порушень [5]. Масштаби та вплив дефіциту інших мікронутрієнтів набагато складніше оцінити, однак цілком очевидно, що деякі їх форми, включаючи дефіцит цинку, вітаміну В₉, є дуже поширеними. Так, 20% населення світу мають дефіцит цинку [6], а ризик його недостатнього споживання існує для 49% [7]. Глобальні масштаби дефіциту фолієвої кислоти (вітаміну В₉) не визначено, але він часто виникає в популяціях з високим рівнем споживання очищених злаків та одноманітним складом раціону [8]. Дефіцит цього вітаміну призводить до виникнення дефектів невральної трубки та інших порушень розвитку і є причиною 300 тис. смертей новонароджених щороку [9], а також серцево-судинних, онкологічних захворювань, порушень розумових функцій тощо. Дефіцит вітамінів групи В часто буває в сукупності, оскільки джерелом різних вітамінів цієї групи є однакові продукти, а очищення, перемелення та видалення зародків у зернових злаків усуває більшість тіаміну (В₁), рибофлавіну (В₂) та ніацину (В₃), вітамін В₉,

залізо та цинк. Дефіцит вітаміну С, окрім інших порушень, спричиняє також і послаблення засвоєння заліза, що провокує дефіцит останнього [6]. Ендемічний дефіцит селену виникає в регіонах зі зниженим його вмістом у ґрунті; рослини, вирощені на таких ґрунтах, і, відповідно, корми та продукти з них містять недостатньо селену [10, 11].

У багатьох країнах звичними є множинні дефіцити за сукупностями мікронутрієнтів, коли значна частина населення через обмежені матеріальні ресурси не може забезпечити набір продуктів з високою біологічною цінністю. Динамічні спостереження за станом фактичного харчування в Україні свідчать, що понад 50% населення України харчується неякісно [12]. Так, відповідно до оцінок ВООЗ, близько 9% невагітних та 27% вагітних жінок, 22% дітей дошкільного віку в Україні мають анемію, у виникненні якої одним із найбільш суттєвих чинників є дефіцит заліза [2]. У 24% дітей дошкільного віку спостерігається фізіологічний дефіцит вітаміну А, а в 2,5% вагітних — нічна сліпота як наслідок дефіциту вітаміну А [6, 13]. У 70% дітей дошкільного віку існує дефіцит йоду [14], 16% населення має ризик неадекватного споживання цинку [15]. В Україні відзначаються також досить високі рівні виникнення вроджених вад розвитку у новонароджених, серед яких досить поширеними є вроджені дефекти невральної трубки [16], виникнення останніх здебільшого зумовлено дефіцитом фолієвої кислоти в організмі матері та плоду [17, 18]. З метою запобігання вродженим вадам розвитку [19, 20] в нашій країні свого часу розпочалася діяльність, спрямована на подолання дефіциту фолієвої кислоти у жінок репродуктивного віку шляхом її внесення у борошно та хлібобулочні вироби. Це є наочним прикладом

успішної промислової фортифікації. Ефективність застосування таких заходів для подолання вад розвитку невральної трубки підтверджена численними дослідженнями [21–25].

Як вже згадувалося, змінити поживні властивості рослинної харчової сировини можна не лише вносячи до її складу ті чи інші компоненти, але й змінюючи властивості самих рослин селекційним шляхом та завдяки генетично-інженерним технологіям. Утім, традиційна селекція ще не повністю вичерпала потенціал для отримання нових сортів основних харчових культур (кукурудзи, ріпаку, пшениці, квасолі, рису) з підвищеним вмістом мікронутрієнтів завдяки існуючій генетичній варіації в накопиченні цільових речовин [26]. Результати дослідження такої варіації для окремих сільськогосподарських рослин наведено в табл. 1. У пшениці та деяких інших культур виявлено суттєву генетичну варіацію вмісту так званих промоторних речовин, зокрема інуліну, які сприяють ефективному засвоєнню вітамінів та мінералів, що може бути використано традиційною селекцією для непрямого підвищення біологічної цінності рослинних харчових продуктів [27]. Мутації, які зумовлюють знижений вміст фітатів у кукурудзи, ячменю та рису, дозволили створити традиційними методами сорти відповідних культур зі зниженим вмістом солей фітинової кислоти в насінні і, відповідно, підвищеною біодоступністю мінеральних іонів при споживанні тваринами, підтвердженою дослідженнями [28]. Встановлено генотипну варіацію вмісту селену в сочевиці, яку передбачається використати для біофортифікації даної культури [29].

Однак для реалізації стратегії біофортифікації, ефективність традиційних методів селекції дещо обмежена порівняно зі значно

Таблиця 1. Генетично зумовлена варіація вмісту мікронутрієнтів у деяких сільськогосподарських культурах (мг/кг сухої маси) [27]

Сільськогосподарська культура		Варіація вмісту мікронутрієнта			
		Fe	Zn	Бета-каротин ^{***}	Аскорбінова кислота
Рис	коричневий	6–25	14–59	0–1	–
	очищений	1–14	14–38	–	–
Маніока	корені	4–76	3–38	1–24*	0–380*
	листя	39–263	15–109	180–960*	17–4200*
Квасоля		34–111**	21–54	0	–
Кукурудза		10–63	12–58	0–10	–
Пшениця		10–99**	8–177**	0–20	–

Примітка: * — для сирої маси; ** — включаючи диких родичів; *** — спектр для загального вмісту каротиноїдів набагато ширший.

ширшими можливостями методів генетичної інженерії. Тому біотехнологічні підходи дедалі ширше використовують для створення рослин з поліпшеними ознаками.

Існуючі стратегії дослідження функціонування генів та їх продуктів, поряд з ефективними методами трансформації та вдосконаленими системами оцінки якості нових отриманих рослин, дозволили встановити обмежувальні етапи у біосинтезі певних сполук і забезпечити основу для генетичного конструювання відповідних шляхів метаболізму рослин з підвищеною продуктивністю. Спрямовану експресію можна застосовувати для надання метаболічного нового напрямку, тоді як завдяки механізмам інгібування експресії генів можна зменшити або елімінувати небажані ознаки [30, 31].

Більшість рослин мають недостатній для задоволення потреб людини і тварин вміст основних амінокислот. Злаки (кукурудза, пшениця, рис тощо) зазвичай містять мало лізину, тимчасом як бобові (соя, квасоля, горох) часто бідні на сірковмісні амінокислоти метіонін та цистеїн. Вдалі приклади поліпшення амінокислотного балансу шляхом підвищення вмісту лізину описано для кукурудзи [32, 33], ріпаку та сої [34]. Зокрема в геном кукурудзи було внесено ген *dapA* бактерії *Corynebacterium glutamicum* Abe., що кодує чутливу до концентрації лізину форму ензиму дигідродіпіколінатсинтетази [35]. Але підвищений вміст лізину спостерігався лише в частини трансгенних рослин, що було зумовлено особливостями метаболічної регуляції. Введення генів, які кодують протеїни з бажаним вмістом амінокислот дає змогу спрямовано модифікувати склад запасного протеїну рослин, а проблему дефіциту в харчуванні окремих амінокислот може бути вирішено введенням в рослинний геном гена повністю штучного протеїну з підвищеним їх вмістом. Зокрема було створено й інтродуковано в сою під контролем насіннеспецифічного промотору синтетичний протеїн масою 11 кДа, що містив 16% метіоніну та 12% лізину [35, 36]. Аналогічним чином було модифіковано батат, що спричинило 2- та 5-кратне зростання загального вмісту протеїну в листі та коренях, відповідно [37]. Поряд із цим спостерігалось також значне підвищення вмісту амінокислот метіоніну, триптофану, треоніну, ізoleyцину та лізину [37, 38]. Оскільки такі протеїни є повністю новими в раціоні людини, можливий вплив їх на здоров'я має бути детально досліджено. Є повідомлення про можливість непрямого

підвищення вмісту протеїнів і ліпідів у зернівках [39]. Використовуючи ген бактеріального ензиму цитокінінсинтезуючої ізопентенілтрансферази, було спровоковано утворення двох (замість одного) життєздатних зародків. У результаті отримали кукурудзу, зерно якої мало вищий вміст жирів та протеїнів і знижений вміст вуглеводів.

Фруктани (полімери фруктози) — важливий компонент повноцінної їжі; є докази позитивного впливу їх на здоров'я людини (як пробіотичних агентів) і запобігання онкологічним захворюванням шлунково-кишкового тракту. Деякі дослідження виявили високі рівні накопичення фруктанів у трансгенному цукровому буряку без негативного впливу на ріст чи фенотип рослини [40]. Існує сорт трансгенної картоплі, що синтезує спектр молекул інуліну (різновид фруктанів), які в природних умовах присутні в коренях артишоку [41]. Такі самі підходи було застосовано для різновидів сої, що містять деякі олігофруктанові компоненти, які здатні селективно збільшувати популяцію корисних видів бактерій у кишечнику людини і деяких тварин, та інгібують ріст шкідливих бактерій (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp.) [42]. Створено генно-інженерну картоплю, яка містить крохмаль, що повільно перетравлюється через переважання вмісту амілози над вмістом амілопектину [43]. Клінічні дослідження показали, що цей «повільний» вид крохмалю за властивостями подібний до харчових волокон і має потенційну користь для людини [44, 45]. Маніпулювання вмістом та композицією харчових волокон у рослинах, кількісний та якісний склад яких безсумнівно перебуває під генетичним контролем, за допомогою біотехнологічних методів є також перспективним підходом до поліпшення якості продукції.

Використовуючи генетичну інженерію, можна оптимізувати склад жирів олійних культур. Приклади модифікованих олій — це олії зі змінним складом з ріпаку [46–49], сої [50, 51], бавовни [30, 52], кукурудзи [39], льону [53] тощо. Суттєвих змін жирнокислотного складу олійних культур було досягнуто шляхом традиційної селекції та індукованого мутагенезу. Продуктом модифікацій є рослини, з яких отримують олії з бажаними властивостями: соєва та ріпакова, що містять мало або взагалі не містять насичених жирних кислот, ріпакова з підвищеною часткою жирних кислот з карбоновими ланцюгами середньої довжини, з високим вмістом стеаринової кислоти, соєва з високим вмістом мононенасиченої олеїнової кислоти,

ріпакова з поліненасиченою гамма-ліноленовою і стеаридоною, довголанцюговими [54] та омега-3-жирними кислотами [55]. Експресія ацилтіоестерази з рослини *Cuphea hookeriana Walp.* у насінні трансгенного ріпаку дозволила отримати олію з високим вмістом капринової та каприлової кислот, які природно не накопичуються цією рослиною [47]. Інгібування експресії олеатдесатурази в сої сприяло тому, що вміст олеїнової кислоти в олії отриманих рослин досяг 80% (зазвичай — 23%), а поліненасичених жирних кислот — знизився [51]. Соева олія з високим вмістом олеїнової кислоти природно більш стійка до деградації під дією нагрівання та окиснення і отже майже не потребує гідрогенізації, що дозволяє отримати продукт без трансізомерів жирних кислот. Рослини ріпаку, до складу олії яких входять омега-3-ненасичені жирні кислоти, одержано шляхом внесення гена дельта-6-десатурази гриба з роду *Mortierella* [56]. Також створено соняшник, олія з насіння якого містить до 40% гамма-ліноленової кислоти, що в чотири рази більше, ніж у рослинах, які традиційно використовують для отримання цієї кислоти [57].

Завдяки тому, що було ізольовано ген ензиму гамма-токоферолметилтрансферази, який перетворює попередників з низькою біологічною активністю на більш активну складову вітаміну Е — альфа-токоферол [57], його вміст у насінні *Arabidopsis* було збільшено в 10 разів; подібний підхід застосовують для таких культур, як соя, кукурудза, ріпак. Створено трансгенну кукурудзу, в якій модифіковано одночасно три метаболічні шляхи синтезу цільових сполук, і, порівняно зі звичайними сортами, її ендосперм характеризується 169-кратним підвищенням вмісту бета-каротину, 6-кратним — аскорбінової кислоти та 2-кратним — фолату [58, 59]. Шліфоване зерно рису не містить бета-каротину та каротиноїдних попередників. Було клоновано більшість генів біосинтезу каротиноїдів рослин, на основі чого створили лінію рису з експресією бета-каротину в ендоспермі [60], переваги споживання якого вже доведено [39]. Отримано також трансгенні рослини рису, зерно якого містить втричі більше заліза, ніж зерно звичайного рису, завдяки введенню гена феритину сої під контролем ендосперм-специфічного промотору [61]. З метою подальшого підвищення вмісту заліза в зерні зараз активно вивчають можливість спрямовано впливати на його транспорт в рослинному організмі. Значно підвищено вміст біодоступного заліза в трансгенних рослинах куку-

рудзи за рахунок ендосперм-специфічної експресії привнесених генів рекомбінантного соєвого феритину та фітази гриба з роду *Aspergillus* [62]. Подібні результати було досягнуто для салату-латука [63]. Проведено дослідження внутрішньовидової генетичної варіації накопичення кальцію і магнію серед різновидів капусти (*Brassica oleracea* L.) та визначення відповідних QTL з метою подальшого створення трансгенних рослин з підвищеним вмістом цих елементів [64].

Серед інших здобутків — підвищена біодоступність фосфору, зниження рівня фітатів, підвищений вміст ізофлавоноїдів, збагачені фолатами томати [65, 66]. Епідеміологічні дослідження показали потенційну користь каротиноїду лікопену для зменшення ризику виникнення раку простати. У процесі створення томатів зі сповільненим досяганням неочікувано отримали рослини, плоди яких мали підвищений в 2–3,5 рази вміст лікопену порівняно з традиційними рослинами [67]. Стильбени, зокрема ресвератрол, що синтезуються багатьма видами рослин, виявляють антиканцерогенну дію [68], покращують стан хворих на серцево-судинні захворювання [69, 70], а також, імовірно, можуть подовжувати тривалість життя людини і тварин, впливаючи на генетичні механізми реалізації процесу старіння [71]. Накопичення ресвератролу було досягнуто у рослин люцерни, пшениці, ківі та томатів [72–77]. Інші сполуки, що викликають інтерес з погляду біофортифікації рослинної продукції, — це флавоноїди, глюкозинати та пов'язані з ними катехін і катехол; ізофлавонони, зокрема геністеїн та дайдезін; антоціаніни та деякі фітоалексини.

Рослини продукують захисні сполуки, і багатьом із них, таким як ресвератрол та глюкозинати, притаманна значна протективна активність в організмі людини. Однак використання таких речовин може мати й протилежний ефект. Наприклад, фітат — запасна сполука фосфору в рослинах, є антинутриєнтом, який зв'язує залізо, кальцій, цинк та інші двовалентні мінеральні іони, що ускладнює їх засвоєння. Людина і тварини, окрім жуйних, не мають ензиму фітази, необхідного для руйнування фітатів, що, з одного боку, унеможливорює засвоєння накопиченого в них фосфору, а з іншого — спричинює транзитне проходження через організм зв'язаних з фітатами іонів [78]. Надлишок фосфатів, які виробники тваринної продукції штучно додають у раціони тварин, екскретується в навколишнє середовище як забрудник. Використання сої та

кукурудзи з низьким вмістом фітатів для годування тварин може суттєво зменшити екскрецію фосфатів. Експериментально показано, що протеїн сортів сої зі зниженим вмістом фітатів краще перетравлюється, ніж протеїн традиційних соєвих бобів [79]. Кукурудзу зі зменшеним вмістом фітатів було комерціалізовано у США в 1999 р. [80].

Іншими антинутрієнтами, усунення яких з рослинних продуктів становить важливе завдання, є інгібітори трипсину, лектини та деякі стійкі до нагрівання компоненти, відомі у сої та деяких рослин. Окрім того, розпочалися й активно проводяться дослідження з видалення чи зниження рівня в рослині харчових алергенів (альбуміни, глобуліни тощо), токсинів (глікоалкалоїди, ціаногенні глікозиди, фітогемаглютиніни), а також інших небажаних харчових компонентів, зокрема глютену, кофеїну тощо [81]. Генно-інженерними методами створено сою, що не містить алергена р34, відповідні клінічні дослідження підтвердили відсутність накопичення специфічних антитіл у чутливих людей при її споживанні [31], а також рис, що не містить алергенних протеїнів 14–16 кДа [82]. Зміна рівня експресії гена тиредоксину в пшениці та інших злаках дозволяє еліминувати сполуки, що спричинюють негативні ефекти [83]. Біотехнологічні методи можуть бути використані для суттєвого послаблення експресії або навіть елімінації генів, що відповідають за накопичення та/або активацію небажаних сполук у рослинах. Наприклад в деяких лініях картоплі суттєво зменшено вміст соланіну, робляться також спроби знизити загальний вміст глікоалкалоїдів тощо [84]. Використання експресії ензиму маніоки гідроксинітрилліази в її коренях дозволило створити рослини зі зниженим вмістом ціаногенних глікозидів [85].

У табл. 2 узагальнено інформацію про сільськогосподарські культури, які були генетично модифіковані з метою поліпшення їхніх харчових властивостей.

Таким чином, доступні зараз методи геноміки та біоінформатики дали можливість маніпулювати генами в межах видів, родів та царств і вивчати експресію та взаємодію трансгенів із множинами ендогенних генів одночасно. Використання нових можливостей та більш поглиблене і детальне вивчення вторинного метаболізму рослин дадуть змогу ефективно модифікувати поживний склад різних сільськогосподарських культур [80].

Водночас питання безпеки нових харчових продуктів, що отримані генно-інженерним шляхом, є предметом постійної

й цілком зрозумілої уваги. Стосовно цього варто зауважити, що такі міжнародні організації, як ФАО та ВООЗ, дійшли висновку, що потенційно небезпечні фактори, пов'язані з технологією генетичної модифікації, нічим не відрізняються від небезпечних факторів, що пов'язані з методами, які широко використовують за традиційної селекції, однак потребують ретельного вивчення молекулярних характеристик [81–122].

Початковим пунктом оцінювання безпеки харчового продукту, одержаного з генетично модифікованого організму, є так звана концепція «композиційної еквівалентності» з найбільш подібним не трансгенним продуктом, у цьому разі композиційну еквівалентність чи відсутність її встановлюють для визначення подальшої оцінки безпеки. Такий підхід не дає змоги встановити абсолютну безпеку і на основі того, що модифікований продукт є композиційно еквівалентним відповідному звичайному продукту, можна лише стверджувати, що він так само безпечний, як і відповідний, і таким його варто розглядати [122]. Це виправдано з огляду на те, що більшість традиційних рослинних харчових продуктів зі значним досвідом споживання людиною містять ті чи інші небезпечні речовини (соланін та хаколін — картопля, лінамарин — лімська квасоля, ціаногенні глікозиди — корені маніоки, лотаустралін — турецький горох, численні алергени), про що вже згадувалося вище, але загальноприйняті методи та способи оброблення, приготування і споживання мінімізують дію на організм людини цих небажаних сполук.

Проведені дослідження показують, що генетично змінені рослини мають склад більш подібний до батьківських ліній, які використано для їх розроблення, ніж інші лінії того самого виду і роду, а часто через різні умови та місце вирощування існує навіть сильніша варіація, ніж та, що була наслідком модифікації. Цей ефект, зокрема, спостерігався у протеомі картоплі [123], томатів [124] та пшениці [125]. Паралельні результати відзначено у метаболомних рівнях пшениці [126] і картоплі [127]. Це свідчить на користь безпеки рослин з модифікованими властивостями, адже мінливість їхнього складу не виходить за межі складу рослин, стосовно яких існує досвід тривалого споживання.

За добу людина споживає близько 0,1–1 г чужинної ДНК [128], однак досі відсутні повідомлення про включення інтактних генів чи фрагментів ДНК з харчових продуктів у генетичний матеріал людини чи тварин. Немає основ для припущень, що перенесення

Таблиця 2. Генетично модифіковані рослини з поліпшеними харчовими властивостями

Ознака, за якою проводили модифікацію	Рослинна культура (предмет і напрям модифікації)	Джерело
Вміст і склад протеїну	Ріпак (АК склад)	46
	Кукурудза (АК склад, протеїн ↑)	34, 39, 86
	Картопля (АК склад, протеїн ↑)	87–89
	Рис (АК склад, протеїн ↑)	90
	Соя (баланс АК)	91, 92
	Батат (протеїн ↑)	37
Амінокислотний склад	Ріпак (лізин ↑)	34
	Кукурудза (лізин ↑, метіонін ↑)	92
	Картопля (метіонін ↑)	93
	Сорго (лізин ↑)	95
	Соя (лізин ↑, триптофан ↑)	36, 96
Вміст і склад жирних кислот	Ріпак (лаурилова к-та ↑, гамма-ліноленова к-та ↑; +ω-3-жирні к-ти; 8:0 та 10:0 жирні к-ти ↑; лаурилова та міристинова к-та ↑; олеїнова к-та ↑)	44–49
	Бавовна (олеїнова ↑, олеїнова + стеаринова к-ти ↑)	30, 52
	Насіння льону (+ω-3- та ω-6-жирні к-ти)	53
	Кукурудза (ліпіди ↑)	39
	Рис (α-ліноленова к-та ↑)	97
	Соя (олеїнова к-та ↑, гамма-ліноленова к-та ↑)	50, 51
Вміст вуглеводів	Кукурудза (фруктан ↑)	98
	Картопля (фруктан ↑)	99
	Цукровий буряк (фруктан ↑)	100
	Соя (фруктоза ↑, рафіноза ↑)	101
	Картопля (інулін ↑)	41
	Картопля (амілоза ↑)	43
	Рис	102
Вміст вітамінів та каротиноїдів	Ріпак (вітамін Е ↑)	58
	Кукурудза (вітамін Е ↑, вітамін С ↑)	103–105
	Гірчиця (+бета-каротин)	106
	Картопля (+бета-каротин та лютеїн ↑)	107
	Рис (+бета-каротин)	60
	Полуниця (вітамін С ↑)	109
	Томати (фолат ↑, фітоен ↑, бета-каротин ↑, лікопен ↑, провітамін А ↑)	65, 67, 109–112
Вміст функціональних вторинних метаболітів	Яблуня (+стильбени)	72
	Люцерна (+ресвератрол)	73
	Ківі (+ресвератрол)	74
	Кукурудза (флавоноїди ↑)	113
	Картопля (антоціан та алкалоїдні глікозиди ↓, соланін ↓)	114
	Рис (флавоноїди ↑, +ресвератрол)	75, 115
	Соя (флавоноїди ↑)	116
	Томати (+ресвератрол, хлорогенова к-та ↑, флавоноїди ↑, стильбен ↑)	76, 77, 109, 117
Біодоступність мінералів	Люцерна (фітаза ↑)	118
	Салат-латук (залізо ↑)	63
	Рис (залізо ↑)	60
	Кукурудза (фітаза ↑, феритин ↑)	62
	Соя (фітаза ↑)	119
	Пшениця (фітаза ↑)	120

Примітка. ↑ — підвищення вмісту; ↓ — зниження вмісту; «+» — привнесення нової ознаки. Модифіковано з [38, 78, 123].

генів із ГМ рослин більш імовірно, ніж перенесення генів від будь-яких інших рослин, також немає документально зафіксованих даних про те, що гени з рослин переносяться в мікроорганізми кишечника [122]. Численні дослідження показали, що специфічні фрагменти ДНК або протеїни, що походять від генетично модифікованих рослин, не виявляють у тканинах та рідинах сільськогосподарських тварин, яких годували цими рослинами. Немає відтворених даних про те, що модифікована ДНК у комерціалізованих генно-інженерних рослинах має особливу поведінку, порівняно з ДНК звичайних рослин [129]. Беручи до уваги ці фактори та з урахуванням застосовуваних на цей час методів для здійснення генетичних модифікацій, було зроблено висновок, що «ДНК із ГМО є такою ж безпечною, як і будь-яка інша ДНК, що присутня в їжі» [130].

Складніші втручання в метаболізм рослин потребуватимуть більш суворого контролю, ніж прості модифікації. Невід'ємною частиною процесу оцінювання має бути складання повної молекулярної характеристики введених генів і врахування наслідків перенесення, якщо воно відбудеться. Існуючі на сьогодні системи моніторингу та оцінки безпечності уможливають ефективно виявлення небажаних відхилень та запобігання негативним наслідкам використання генетичної модифікації рослин [38, 121, 131].

У контексті сказаного цілком очевидно, що активна реалізація стратегії біофортифікації дозволить отримувати й використовувати рослини з поліпшеними та новими цінними властивостями, які значно краще забезпечуватимуть потреби людства у якісних, поживних і здорових харчових продуктах, що в межах інтегрованого комплексу заходів із модифікації рослин для різних цілей сприятиме вирішенню глобальних проблем на фоні запровадження принципово нового господарювання та прогресивного розвитку. Незважаючи на очевидні здобут-

ки методів традиційної селекції, зараз пріоритетним напрямом для отримання рослин з поліпшеними та новими властивостями є використання біотехнологічних прийомів, зокрема генетичної інженерії, які мають низку суттєвих переваг у використанні, порівняно з традиційними, але, поряд із цим, привертають цілком зрозумілу увагу до питання про їх безпечність. Виправданим і розумним у цій ситуації є застосування поміркованого, цивілізованого, науково обґрунтованого підходу до вирішення питань, які нині є предметом суперечок і обмежують використання генетичної інженерії рослин, створення системи регулювання, яка дозволить максимально використати переваги нових технологій і, водночас, уникнути чи мінімізувати пов'язані з цим ризики.

Світове співтовариство в низці документів Copenhagen Consensus 2008 сформулювало 30 пріоритетних стратегій, застосування яких сприятиме найбільш ефективному та економічно здійсненному вирішенню основних світових проблем [132]. У цих документах окреслено 10 головних загальносвітових проблем, вирішення яких передбачає застосування різних стратегій. Однією з головних проблем сучасності визначено проблему голоду та недоїдання. Розв'язання її, поряд з низкою інших заходів, передбачає застосування стратегії біофортифікації, яка визнається такою, що має великий потенціал і серед запропонованих загалом 30 стратегій для вирішення глобальних проблем посідає 5-те місце за показником співвідношення необхідних для реалізації витрат/масштабів очікуваного позитивного впливу внаслідок цієї реалізації [133, 134], що також ілюструє табл. 3.

Україна, як євродержава з потужним сільськогосподарським потенціалом, має не повторювати помилок минулого і в жодному разі не може залишатись осторонь глобальних процесів, що передбачають вирішення нагальних проблем, пов'язаних з якістю та достатністю харчування завдяки сучасній біотехнології.

Таблиця 3. Зіставлення потенційних результатів застосування різних стратегій для вирішення світових проблем, пов'язаних із харчуванням, на прикладі ефективності використання коштів у сумі 80 млн. дол. США [16]

Тип стратегії та результат застосування		
Розповсюдження фармпрепаратів, що містять терапевтичні дози вітамінів	Фортифікація	Біофортифікація з використанням методів традиційної селекції
80 млн. жінок і дітей у Пд. Азії (кожен 15-й від загальної чисельності населення регіону) протягом двох років зможуть отримувати препарат вітаміну А	Фортифікація харчових продуктів залізом для 33% населення Пд. Азії протягом двох років	Створення шести сільськогосподарських культур з підвищеним вмістом мікронутрієнтів для розповсюдження в усьому світі та використання протягом необмеженого періоду часу

ЛІТЕРАТУРА

1. *The World Health Report 2002: reducing risks, promoting healthy life: overview.* — Geneva: WHO, 2002 (WHO/WHR/02.1).
2. *Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005/* Eds. Benoist B., McLean E., Egli J. et al. — WHO global database on anaemia. — Geneva: WHO, 2008.
3. *Iron deficiency anaemia: assessment, prevention and control. A guide for programme managers.* — Geneva: WHO, 2001 (WHO/NHD/01.3).
4. *Global Prevalence of Vitamin A Deficiency.* Micro-nutrient Deficiency Information. Syst. Work. Pap. No. 2. — Geneva: WHO, 1995 (WHO/NUT/95.3).
5. *De Benoist B., Andersson M., Egli I. et al.* Iodine status worldwide // WHO Global Database on Iodine Deficiency. — Geneva: WHO, 2004.
6. *Allen L., de Benoist B., Dary O. et al.* Guidelines on food fortification with micronutrients. — WHO. FAO UN, 2006.
7. *Brown K. H., Wuehler S. E.* Zinc and human health: Results of recent trials and implications for program interventions and research. — Ottawa, Canada: The Micronutrient Initiative / International Development Research Centre, 2000.
8. *McLean E., de Benoist B., Allen L. H.* Review of the magnitude of Folate and Vitamin B12 deficiencies worldwide. — Geneva: WHO, 2005.
9. *Shibuya K., Murray C. J. L.* Congenital anomalies / Murray C. J. L., Lopez A. D., eds. Health dimensions of sex and reproduction. — Boston: Harvard University Press, 1998. — P. 455–512.
10. *Fox T. E., Fairweather-Tait S.* Selenium // The mineral fortification of foods. — Leatherhead, Surrey, Leatherhead Publishing, 1999. — P. 112–153.
11. *Trace Elements in Human Nutrition and Health.* — Geneva: WHO, 1996.
12. *Корецький В. Л., Орлова Н. М.* До проблеми безпеки харчування та моніторингу якості життя населення України // Пробл. харчування. — 2006. — № 1. — С. 42–44.
13. *WHO.* Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995–2005 // WHO global database on vitamin A deficiency. — Geneva: WHO, 2009.
14. *WHO global database on iodine deficiency* (<http://www.who.int/vmnis/iodine/data/en/index.html>).
15. *Proportion of population at risk of inadequate intake of zinc* // IZiNCG, Estimated Risk of Zinc deficiency by Country. — FNB. — 2004. — V. 25, N 1.
16. *Баріляк І. Р.* Проблеми профілактики спадкової патології та вроджених вад розвитку // Журн. АМН України. — 2003. — Т. 9, № 4. — С. 656–667.
17. *Czeizel A. E.* Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation // N. Engl. J. Med. — 1992. — V. 327, N 26. — P. 1832–1835.
18. *Walle H. E. K. de, Reefhuis J., Cornel M. C.* Folic acid prevents more than neural tube defects; a registry-based study in the Netherlands // Eur. J. Hum. Gen. — 2001. — V. 9, N 51. — P. 261.
19. *Баріляк І. Р., Вертелецький В.* Роль громадських організацій у формуванні охорони здоров'я // Тези доп. IX конгресу СФУЛТ (Луганськ, 19–22 серпня 2002 р.) — Луганськ — Київ — Чикаго, 2002. — С. 74.
20. *Baryliak I., Kharytonova I., Wertelecky W.* Promotion of birth defects prevention Aliances // Eur. J. Hum. Gen. — 2001. — V. 9. — P. 175.
21. *Czeizel A. E., Dudas I.* Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation // N. Engl. J. Med. — 1992. — V. 327, N 26. — P. 1832–1835.
22. *Wald N., Sneddon J., Densm J. et al.* Prevention of neural tube defects: results of the medical research council vitamin study // Lancet. — 1991. — V. 338, N 8760. — P. 131–137.
23. *Berry R. J., Li Z., Erickson J. D. et al.* Prevention of neural tube defects with folic acid in China // N. Engl. J. Med. — 1999. — V. 341, N 20. — P. 1485–1490.
24. *Van Allen M. I., Boyle E., McFadderi D. et al.* The impact of prenatal diagnosis and folic acid (FA) supplementation on prevention of neural tube defects in British Columbia // Europ. J. Hum. Gen. — 2001. — V. 9, N 51. — P. 162.
25. *Баріляк І. Р., Качура В. С., Неумержицька Л. В., Кузнєцова Г. М.* Антитератогенна дія фолієвої кислоти та її роль в запобіганні злоякісних пухлин і серцево-судинних захворювань // Совр. пробл. токсикол. — 2002. — № 2. — С. 7–14.
26. *Biofortified Crops For Improved Human Nutrition. A Challenge Program Proposal.* International Center For Tropical Agriculture (CIAT). Food Policy Research Institute (IFPRI) / International Consortium of Collaborative Partners. — 3 September 2002.
27. *Genc Y., Humphries J. M., Lyons G. H., Graham R. D.* Exploiting genotypic variation in plant nutrient accumulation to alleviate micronutrient deficiency in populations // J. Trace Elem. Med. Biol. — 2005. — V. 18, N 4. — P. 319–24.
28. *Raboy V.* Progress in Breeding Low Phytate Crops // J. Nutr. — 2002. — V. 132. — P. 503–505.
29. *Thavarajah D., Ruszkowski J., Vandenberg A.* High potential for selenium biofortification of lentils (*Lens culinaris L.*) // J. Agric. Food Chem. — 2008. — V. 56, N 22. — P. 10747–10753.
30. *Liu Q., Singh S., Green A.* High-oleic and high-stearic cottonseed oils: nutritionally improved cooking oils developed using gene silencing // J. Am. Coll. Nutr. — 2002. — V. 21. — P. 205–211.
31. *Herman E. M., Helm R. M., Jung R., Kinney A. J.* Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean // Plant. Physiol. — 2003. — V. 132. — P. 36–43.
32. *O'Quinn P. R., Nelssen J. L., Goodband R. D. et al.* Nutritional value of a genetically improved high-lysine, high-oil corn for young pigs // J. Anim. Sci. — 2000. — V. 78. — P. 2144–2149.
33. *Eggeling L., Oberle S., Sahm H.* Improved L-lysine yield with *Corynebacterium glutamicum*:

- use of *dapA* resulting in increased flux combined with growth limitation // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 1998. — V. 49. — P. 24–30.
34. *Falco S. C., Guida T., Locke M. et al.* Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine // *Biotechnology.* — 1995. — V. 13. — P. 577–582.
 35. *Beauregard M., Dupont C., Hefford M.A.* Design, expression and initial characterization of MB1, a *de novo* protein enriched in essential amino acids // *Ibid.* — 1995. — V. 13. — P. 974–981.
 36. *Simmonds D. H., Donaldson P. A.* Genotype screening for proliferative embryogenesis and biolistic transformation of short-season soybean genotypes // *Plant. Cell. Rep.* — 2000. — V. 19. — P. 485–490.
 37. *Egnin M., Prakash C. S.* Transgenic sweet potato expressing a synthetic storage protein gene exhibits high level of total protein and essential amino acids // *In Vitro Cell. Dev. Biol.* — 1997. — V. 33. — P. 52.
 38. *International Life Sciences Institute.* Nutritional and safety assessments of foods and feeds nutritionally improved through biotechnology: case studies // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* — 2008. — V. 7. — P. 50–99.
 39. *Young T. E., Giesler-Lee J., Gallie D. R.* Senescence-induced expression of cytokinin reverses pistil abortion during maize flower development // *Plant J.* — 2004. — V. 38. — P. 910–922.
 40. *Sévenier R., Hall R. D., van der Meer I. M. et al.* High level fructan accumulation in a transgenic sugar beet // *Nat. Biotechnol.* — 1998. — V. 16. — P. 843–846.
 41. *Hellwege E. M., Czaplak S., Jahnke A. et al.* Transgenic potato (*Solanum tuberosum*) tubers synthesize the full spectrum of inulin molecules naturally occurring in globe artichoke (*Cynara scolymus*) roots // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2000. — V. 97. — P. 8699–8704.
 42. *Bouhnik Y., Vahodi K., Achour L. et al.* Short-chain fructo-oligosaccharide administration dose-dependently increases fecal bifidobacteria in healthy humans // *J. Nutr.* — 1999. — V. 129. — P. 113–116.
 43. *Schwall G. P., Safford R., Westcott R. J. et al.* Production of very-high-amylose potato starch by inhibition of SBE A and B // *Nat. Biotechnol.* — 2000. — V. 18. — P. 551–554.
 44. *Yue P., Waring S.* Resistant starch in food applications // *Cereal Foods World.* — 1998. — V. 43. — P. 690–695.
 45. *Richardson P. H., Jeffcoat R., Shi Y. C.* High-amylose starches: from biosynthesis to their use as food. — *MRS Bull.* December, 2000. — P. 20–24.
 46. *Roesler K., Shintani D., Savage L. et al.* Targeting of the Arabidopsis homomeric acetyl-coenzyme A carboxylase to plastids of rapeseeds // *Plant Physiol.* — 1997. — V. 113 — P. 75–81.
 47. *Dehesh K., Jones A., Knutzon D. S., Voelker T. A.* Production of high levels of 8:0 and 10:0 fatty acids in transgenic canola by overexpression of Ch FatB2, a thioesterase cDNA from *Cuphea hookeriana* // *Plant J.* — 1996. — V. 9. — P. 167–172.
 48. *Froman B., Ursin V.* Genetic modification of oils for improved health benefits: production of long chain omega-3 fatty acids in plants // *Abst. Papers Amer. Chem. Soc.* — 2002. — V. 223. — U. 35.
 49. *James M. J., Ursin V. M., Cleland L. G.* Metabolism of stearidonic acid in human subjects: comparison with the metabolism of other n-3 fatty acids // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2003. — V. 77. — P. 1140–1145.
 50. *Reddy A. S., Thomas T. L.* Expression of a cyanobacterial DELTA 6-desaturase gene results in gamma-linolenic acid production in transgenic plants // *Nat. Biotechnol.* — 1996. — V. 14. — P. 639–642.
 51. *Kinney A. J., Knowlton S.* Designer oils: the high oleic acid soybean // *Genetic Modification in the Food Industry - Blackie Academic and Professional, London, 1998.* — P. 193–213.
 52. *Chapman K. D., Austin-Brown S., Sparace S. A. et al.* Transgenic cotton plants with increased seed oleic acid content // *J. Am. Oil Chem. Soc.* — 2001. — V. 78. — P. 941–947.
 53. *Abadi A., Domergue F., Bauer J. et al.* Biosynthesis of very-long-chain polyunsaturated fatty acids in transgenic oilseeds: constraints on their accumulation // *Plant Cell.* — 2004. — V. 16. — P. 2734–2748.
 54. *Zou J., Katavic V., Giblin E. M. et al.* Modification of seed oil content and the acyl composition in the *Brassicaceae* by expression of a yeast sn-2 acyltransferase gene // *Ibid.* — 1997. — V. 9. — P. 909–923.
 55. *Yuan L., Knauf V. C.* Modification of plant components // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 1997. — V. 8. — P. 227–233.
 56. *Ursin V.A.* Modification of plant lipids for human health: development of functional land-based omega-3 fatty acids // *Symposium: Improving Human Nutrition through Genomics, Proteomics and Biotechnologies.* American Society for Nutritional Sciences, Bethesda, MD, 2003. — P. 4271–4274.
 57. *Arcadia Biosciences.* Arcadia Biosciences and Bioriginal Food and Science Corp. enter strategic alliance to market high GLA sunflower oil. *Business Wire.* — 2008. (http://findarticles.com/p/articles/mi_mOEIN/is_ai_n24320185).
 58. *Shintani D., Della Penna D.* Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering // *Science.* — 1998. — V. 282. — P. 2098–2100.
 59. *Naqvi S., Zhu C., Ferre G. et al.* Transgenic multivitamin corn through biofortification of endosperm with three vitamins representing three distinct metabolic pathways // *PNAS.* — 2009. — V. 106, N 19. — P. 7762–7767. (www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0901412106).
 60. *Ye X., Al-Babili S., Klott A. et al.* Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm // *Science.* — 2000. — V. 287. — P. 303–305.

61. *Lucca P., Hurrell R., Potrykus I.* Fighting iron deficiency anemia with iron-rich rice // *J. Am. Coll. Nutr.* — 2002. — V. 21. — P. 184–190.
62. *Drakakaki G., Marcel S., Glahn R. P. et al.* Endosperm-specific co-expression of recombinant soybean ferritin and *Aspergillus* phytase in maize results in significant increases in the levels of bioavailable iron // *Plant Mol. Biol.* — 2005. — V. 59. — P. 869–880.
63. *Goto F., Yoshihara T., Saiki H.* Iron accumulation and enhanced growth in transgenic lettuce plants expressing the iron-binding protein ferritin // *Theor. Appl. Genet.* — 2000. — V. 100. — P. 658–664.
64. *Broadley M. R., Hammond J. P., King G. J. et al.* Shoot calcium and magnesium concentrations differ between subtaxa, are highly heritable, and associate with potentially pleiotropic loci in *Brassica oleracea* // *Plant Physiol.* — 2008. — V. 146. — P. 1707–1720.
65. *Della Penna D.* Biofortification of plant-based food: enhancing folate levels by metabolic engineering // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2007. — V. 104. — P. 3675–3676.
66. *Yonekura-Sakakibara K., Tohge T., Niida R., Saito K.* Identification of a flavonol 7-O-rhamnosyltransferase gene determining flavanoid pattern in Arabidopsis by transcriptome coexpression analysis // *J. Biol. Chem.* — 2007. — V. 282. — P. 14932–14941.
67. *Mehta R. A., Cassol T., Li N. et al.* Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality, and vine life // *Nat. Biotechnol.* — 2002. — V. 20. — P. 613–618.
68. *Jang M., Cai L., Udeani G. et al.* Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes // *Science.* — 1997. — V. 275. — P. 218–220.
69. *Frankel E. N., Waterhouse A. L., Kinsella J. E.* Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol // *Lancet.* — 1993. — V. 341. — P. 1103–1104.
70. *Wieder T., Prokop A., Bagci B. et al.* Piceatannol, a hydroxylated analog of the chemopreventive agent resveratrol, is a potent inducer of apoptosis in the lymphoma cell line BJAB and in primary, leukemic lymphoblasts // *Leukemia.* — 2001. — V. 15. — P. 1735–1742.
71. *Baur J. A.* Resveratrol improves health and survival of mice on a highcalorie diet // *Nature.* — 2006. — V. 444. — P. 280–281.
72. *Szankowski I., Briviba K., Fleschhut J. et al.* Transformation of apple (*Malus domestica* Borkh.) with the stilbene synthase gene from grapevine (*Vitis vinifera* L.) and a PGIP gene from kiwi (*Actinidia deliciosa*) // *Plant Cell Rep.* — 2003. — V. 22. — P. 141–149.
73. *Hipskind J. D., Paiva N. L.* Constitutive accumulation of a resveratrolglucoside in transgenic alfalfa increases resistance to *Phoma medicaginis* // *Mol. Plant Microbe Interact.* — 2000. — V. 13. — P. 551–562.
74. *Szankowski I., Briviba K., Fleschhut J. et al.* Kiwifruits (*Actinidia deliciosa*) transformed with a *Vitis* stilbene synthase gene produce piceid (resveratrol-glucoside) // *Plant Cell Rep.* — 2000. — V. 19. — P. 904–910.
75. *Stark-Lorenzen P., Nelke B., Hanssler G. et al.* Transfer of a grapevine stilbene synthase gene to rice (*Oryza sativa* L.) // *Ibid.* — 1997. — V. 16. — P. 668–673.
76. *Niggeweg R., Michael A. J., Martin C.* Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid // *Nat. Biotechnol.* — 2004. — V. 22. — P. 746–754.
77. *Giovinazzo G., d'Amico L., Paradiso A. et al.* Antioxidant metabolite profiles in tomato fruit constitutively expressing the grapevine stilbene synthase gene // *Plant Biotechnol. J.* — 2005. — V. 3. — P. 57–69.
78. *Newell-McGloughlin M.* Nutritionally Improved Agricultural Crops // *Plant Physiol.* — 2008. — V. 147. — P. 939–953.
79. *Keshavarz K.* The effect of different levels of non-phytate phosphorus with and without phytase on the performance of four strains of laying hens // *Poult. Sci.* — 2003. — V. 82. — P. 71–91.
80. *Wehrspann J.* New traits of seed buying // *Farm. Industry News.* — 1998. — V. 31. — P. 10.
81. *Ogita S., Uefuji H., Yamaguchi Y. et al.* Producing decaffeinated coffee plants // *Nature.* — 2003. — V. 423. — P. 823.
82. *Tada Y., Nakase M., Adachi T. et al.* Reduction of 14–16 kDa allergenic proteins in transgenic rice plants by antisense gene // *FEBS Lett.* — 1996. — V. 391. — P. 341–345.
83. *Buchanan B. B., Adamidi C., Lozano R. M. et al.* Thioredoxin-linked mitigation of allergic responses to wheat // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1997. — V. 94. — P. 5372–5377.
84. *McCue K. F., Allen P. V., Rockhold D. R. et al.* Reduction of total steroidal glycoalkaloids in potato tubers using antisense constructs of a gene encoding a solanidine glucosyl transferase // *Acta Hort.* — 2003. — V. 619. — P. 77–86.
85. *Siritunga D., Sayre R. T.* Generation of cyanogen-free transgenic cassava // *Planta.* — 2003. — V. 217. — P. 367–373.
86. *Yang S. H., Moran D. L., Jia H. W. et al.* Expression of a synthetic porcine alpha-lactalbumin gene in the kernels of transgenic maize // *Transgenic Res.* — 2002. — V. 11. — P. 11–20.
87. *Yu J., Ao G.* Expression of 10 kDa sulfur-rich prolamin gene of rice in potato // *Acta. Bot. Sin.* — 1997. — V. 39. — P. 329–334.
88. *Chakraborty S., Chakraborty N., Datta A.* Increased nutritive value of transgenic potato by expressing a nonallergenic seed albumin gene from *Amaranthus hypochondriacus* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2000. — V. 97. — P. 3724–3729.
89. *Li L., Liu S. M., Hu Y. L. et al.* Increase of sulfur-containing amino acids in transgenic potato with 10 kD zein gene from maize // *Chin. Sci. Bull.* — 2001. — V. 46. — P. 482–484.
90. *Katsube T., Kurisaka N., Ogawa M. et al.* Accumulation of soybean glycinin and its assembly with the glutelins in rice // *Plant Physiol.* — 1999. — V. 120. — P. 1063–1074.
91. *Dinkins R. D., Reddy M. S. S., Meurer C. A. et al.* Increased sulfur amino acids in soybean plants overexpressing the maize 15 kDa zein

- protein // *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* — 2001. — V. 37. — P. 742–747.
92. *Rapp W.* Development of soybeans with improved amino acid composition // 93rd AOCs Annual Meeting and Expo, Montreal, 5–8 May 2002. — American Oil Chemists' Society Press, Champaign, IL, 2002. — P. 79–86.
93. *Lai J. S., Messing J.* Increasing maize seed methionine by mRNA stability // *Plant J.* — V. 30. — P. 395–402.
94. *Zeh M., Casazza A. P., Kreft O. et al.* Antisense inhibition of threonine synthase leads to high methionine content in transgenic potato plants // *Plant Physiol.* — 2001. — V. 127. — P. 792–802.
95. *Zhao Z.-Y., Glassman K., Sewalt V. et al.* Nutritionally improved transgenic sorghum // *Plant Biotechnology 2002 and Beyond.* — Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 2003. — P. 413–416.
96. *Galili G., Galili S., Lewinsohn E., Tadmor Y.* Genetic, molecular, and genomic approaches to improve the value of plant foods and feeds // *Plant Sci.* — 2002. — V. 21. — P. 167–204.
97. *Anai T., Koga M., Tanaka H. et al.* Improvement of rice (*Oryza sativa* L.) seed oil quality through introduction of a soybean microsomal omega-3 fatty acid desaturase gene // *Plant Cell Rep.* — 2003. — V. 21. — P. 988–992.
98. *Caimi P. G., McCole L. M., Klein T. M., Kerr P. S.* Fructan accumulation and sucrose metabolism in transgenic maize endosperm expressing a *Bacillus amyloliquefaciens* SacB gene // *Plant Physiol.* — 1996. — V. 110. — P. 355–363.
99. *Hellwege E. M., Gritscher D., Willmitzer L., Heyer A. G.* Transgenic potato tubers accumulate high levels of 1-kestose and nystose: functional identification of a sucrose 1-fructosyltransferase of artichoke (*Cynara scolymus*) blossom discs // *Plant J.* — 1997. — V. 12. — P. 1057–1065.
100. *Smeeckens S.* Engineering plant metabolism // *Trends Plant Sci.* — 1997. — V. 2. — P. 286–287.
101. *Hartwig E. E., Kuo T. M., Kenty M. M.* Seed protein and its relationship to soluble sugars in soybeans // *Crop Sci.* — 1997. — V. 37. — P. 770–773.
102. *Chiang C., Yeh F., Huang L. et al.* Expression of a bi-functional and thermostable amylopullulanase in transgenic rice seeds leads to autohydrolysis and altered composition of starch // *Mol. Breed.* — 2005. — V. 15. — P. 125–143.
103. *Rocheford T. R., Wong J. C., Egesel C. O., Lambert R. J.* Enhancement of vitamin E levels in corn // *J. Am. Coll. Nutr.* — 2002. — V. 21. — P. 191–198.
104. *Cahoon E. B., Hall S. E., Ripp K. G. et al.* Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content // *Nat. Biotechnol.* — 2003. — V. 21. — P. 1082–1087.
105. *Chen Z., Young T. E., Ling J. et al.* Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2003. — V. 100. — P. 3525–3530.
106. *Shewmaker C. K., Sheehy J. A., Daley M. et al.* Seed specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects // *Plant J.* — 1999. — V. 20. — P. 401–412.
107. *Ducreux L. J. M., Morris W. L., Hedley P. E. et al.* Metabolic engineering of high carotenoid potato tubers containing enhanced levels of β -carotene and lutein // *J. Exp. Bot.* — 2005. — V. 56. — P. 81–89.
108. *Agius F., Gonzalez-Lamothé R., Caballero J. L. et al.* Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase // *Nat. Biotechnol.* — 2003. — V. 21. — P. 177–181.
109. *Rosati C., Aquilani R., Dharmapuri S. et al.* Metabolic engineering of β -carotene and lycopene content in tomato fruit // *Plant J.* — 2000. — V. 24. — P. 413–419.
110. *Fraser P. D., Romer S., Kiano J. W. et al.* Elevation of carotenoids in tomato by genetic manipulation // *J. Sci. Food Agric.* — 2001. — V. 81. — P. 822–827.
111. *Dy'az R., Quinlivan E. P., Klaus S. M. et al.* Folate biofortification in tomatoes by engineering the pteridine branch of folate synthesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2004. — V. 101. — P. 13720–13725.
112. *Enfissi E. M. A., Fraser P. D., Lois L. M. et al.* Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato // *Plant Biotechnol. J.* — 2005. — V. 3. — P. 17–27.
113. *Yu O., Jung W., Shi J. et al.* Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume dicot and monocot tissues // *Plant Physiol.* — 2000. — V. 124. — P. 781–794.
114. *Lukaszewicz M., Matysiak-Kata I., Skala J. et al.* Antioxidant capacity manipulation in transgenic potato tuber by changes in phenolic compounds content // *J. Agric. Food Chem.* — 2004. — V. 52. — P. 1526–1533.
115. *Shin Y., Park H., Yim S. et al.* Transgenic rice lines expressing maize C1 and R-S regulatory genes produce various flavonoids in the endosperm // *Plant Biotechnol. J.* — 2006. — V. 4. — P. 303–315.
116. *Yu O., Shi J., Hession A. O. et al.* Metabolic engineering to increase isoflavone biosynthesis in soybean seed // *Phytochemistry.* — 2003. — V. 63. — P. 753–763.
117. *Muir S. R., Collins G. J., Robinson S. et al.* Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols // *Nature.* — 2001. — V. 19. — P. 470–474.
118. *Austin-Phillips S., Bingham E. T., Koegel R. G. et al.* Production of industrial and animal feed enzymes in transgenic alfalfa. — 2008. (<http://www.molecularfarming.com/non-medical.html>).
119. *Denbow D. M., Grabau E. A., Lacy G. H. et al.* Soybeans transformed with a fungal phytase gene improve phosphorus availability

- for broilers // *Poult. Sci.* — 1998. — V. 77. — P. 878–881.
120. *Brinch-Pedersen H., Olesen A., Rasmussen S. K., Holm P. B.* Generation of transgenic wheat (*Triticum aestivum L.*) for constitutive accumulation of an *Aspergillus* phytase // *Mol. Breed.* — 2000. — V. 6. — P. 195–206.
121. *International Life Sciences Institute.* Nutritional and safety assessments of foods and feeds nutritionally improved through biotechnology // *Compreh. Rev. Food Sci. Food Safety.* — 2004. — V. 3. — P. 35–104.
122. *Робинсон К.* Технология генетической модификации и пищевые продукты. Здоровье и безопасность потребителей. // *International Life Sciences Institute. ILSI Europe.* — ILSI Press Translation. — 2003. — 55 с.
123. *Lehesranta S. J., Davies H. V., Shepherd L. V. et al.* Comparison of tuber proteomes of potato varieties, landraces, and genetically modified lines // *Plant Physiol.* — 2005. — V. 138. — P. 1690–1699.
124. *Corpillo D., Gardini G., Vaira A. M. et al.* Proteomics as a tool to improve investigation of substantial equivalence in genetically modified organisms: the case of a virus-resistant tomato // *Proteomics.* — 2004. — V. 4. — P. 193–200.
125. *Shewry P. R.* Tuber storage proteins // *Ann. Bot. (Lond.).* — 2003. — V. 91. — P. 755–769.
126. *Baker J. M., Hawkins N. D., Ward J. L. et al.* A metabolomic study of substantial equivalence of field-grown genetically modified wheat // *Plant Biotechnol. J.* — 2006. — V. 4. — P. 381–392.
127. *Catchpole G. S., Beckmann M., Enot D. P. et al.* Hierarchical metabolomics demonstrates substantial compositional similarity between genetically modified and conventional potato crops // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2005. — V. 102. — P. 14458–14462.
128. *Flachowsky G.* Feeds from genetically engineering plants—Results and future challenges // *ISB News Rep.* — March 2007. — P. 4–7.
129. *Eur. Food Saf. Auth.* EFSA statement of the fate of recombinant DNA or proteins in meat, milk and eggs from animals. — 2007. (<http://www.efsa.europa.eu/EFSA/Statement/gmo> EFSA statement DNA proteins gastroint.pdf).
130. *Jonas D., Elmadfa I., Engel K.-H. et al.* Safety considerations of DNA in foods // *Ann. Nutr. Metab.* — 2001. — V. 45, N 6. — 40 p.
131. *International Life Sciences Institute.* Nutritional and safety assessments of foods and feeds nutritionally improved through biotechnology: an executive summary // *J. Food Sci.* — 2004. — V. 69. — P. 62–68.
132. *Copenhagen Consensus Center.* Copenhagen Consensus 2008 — Results. Press Release. — Copenhagen, Denmark, 30 May 2008. — 2 p.
133. *Copenhagen Consensus Center.* Copenhagen Consensus 2008 — Results. — Copenhagen, Denmark, 30 May 2008. — 6 p.
134. *Horton S., Alderman H., Rivera J.* Copenhagen Consensus 2008. — Malnutrition And Hunger. Executive Summary. — Copenhagen Consensus Center Copenhagen, Denmark, 2008. — 6 p.

БИОФОРТИФИКАЦИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

О. М. Бурлака, Б. В. Сорочинский

Институт пищевой биотехнологии и геномики
НАН Украины, Киев

E-mail: burlaka29@gmail.com

Обсуждается проблема биофортификации, предусматривающая улучшение методами биотехнологии питательных свойств сортов сельскохозяйственных растений. Рассмотрены вопросы пищевого дефицита некоторых минералов и витаминов и негативных последствий этого для здоровья населения, которые можно уменьшить созданием и использованием в пищу растительных продуктов с улучшенными свойствами. Охарактеризованы направления и показаны достижения улучшения пищевой ценности растений методом генетической инженерии.

Ключевые слова: биофортификация, дефицит микронутриентов, генетическая инженерия, улучшение свойств растений.

BIOFORTIFICATION OF FOOD PLANTS

O. M. Burlaka, B. V. Sorochinsky

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

E-mail: burlaka29@gmail.com

Current issues concerning the biofortification of staple food plants and its application for biotechnological improvement of nutritional qualities of varieties are discussed. The problems of nutritional trace minerals and vitamins deficiencies and insufficient nourishment harmful health impacts that can be prevented by development and employment of improved plants are reviewed. Current state and progress in plants' genetic engineering for its increased nutritional value are described.

Key words: biofortification, micronutrient deficiencies, genetic engineering, plant qualities improvement.