


НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ  
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ  
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»  
Факультет біотехнології і біотехніки  
Кафедра біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології

«На правах рукопису»  
УДК 537.6:537.621

До захисту допущено:  
Завідувач кафедри

 Наталія ГОЛУБ

«6» 06 2022 р.

## Магістерська дисертація

на здобуття ступеня магістра

за освітньо-науковою програмою «Біотехнології»

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

на тему: «Біоінформатичний аналіз білків біомінералізації біогенних  
магнітних наночастинок у пробіотиків»

Виконала:

Студентка VI курсу, групи БМ-01мн  
Мізюрко Лілія Анатоліївна



Науковий керівник:

професор кафедри біоенергетики,  
біоінформатики та екобіотехнології, д.т.н., проф.  
Горобець Світлана Василівна




Консультант з розробки стартап проекту:  
доцент кафедри економіки  
та підприємництва, к.е.н.  
Ткаченко Тетяна Петрівна



Рецензент:

професор кафедри загальної фізики  
та моделювання фізичних процесів, д.ф.-м.н., проф.  
Горобець Оксана Юріївна



Засвідчую, що у цій магістерській  
дисертації немає запозичень з праць  
інших авторів без відповідних посилань.  
Студентка  Мізюрко Л.А.

Київ – 2022 року

Національний технічний університет України  
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»  
Факультет біотехнології і біотехніки  
Кафедра біоінформатики


Рівень вищої освіти – другий (магістерський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна (Освітньо-наукова) програма «Біотехнології»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

 Наталія ГОЛУБ

«19» 10 2022р.

### ЗАВДАННЯ

на магістерську дисертацію студенту

Мізюрко Лілії Анатоліївни

1. Тема дисертації «Біоінформатичний аналіз білків біомінералізації біогенних магнітних наночастинок у пробіотиків», науковий керівник дисертації Горобець Світлана Василівна, д.т.н., професор

затверджені наказом по університету від «03» 05 2021 р. № НС/170/2021

2. Термін подання студентом дисертації 09.06 (червень) 2022р

3. Об'єкт дослідження: протеоми магнітотаксисних бактерій та пробіотичних мікроорганізмів, білки біомінералізації біогенних магнітних наночастинок у пробіотичних мікроорганізмів.

4. Вихідні дані:

Предмет дослідження: фізико-хімічні властивості mat-білків магнітотаксисних бактерій та їх гомологів у пробіотичних мікроорганізмів, генетичний механізм біомінералізації біогенних магнітних наночастинок у пробіотичних мікроорганізмів.

5. Перелік завдань, які потрібно розробити:

- Провести огляд літератури стосовно використання магнітотаксисних бактерій і пробіотиків у біомедицинській галузі та в області зеленого синтезу наночастинок.



- Методами порівняльної геноміки визначити здатність до синтезу біогенних магнітних наночастинок (БМН) у обраних пробіотичних мікроорганізмів.
- Методами пакету Biopython мови програмування python розрахувати фізико-хімічні властивості гомологів тат-білків магнітотаксисних бактерій у протеомах пробіотичних мікроорганізмів.
- Розробити стартап-проект.

6. Орієнтовний перелік ілюстративного матеріалу: презентація

7. Орієнтовний перелік публікацій

1. Горобець С.В., Кузьмініч Л.В., Мізюрко Л.А. Вплив хелату феруму на магнітофоретичну рухливість *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745: Матеріали III міжнародної наук.-прак. конф., м. Львів, 29-30 червня 2021 р. Львів, 2021. С. 39-41.
2. Горобець С.В., Мізюрко Л.А., Біоінформатичний аналіз білків біомінералізації біогенних магнітних наночастинок у пробіотиків. «Біотехнологія XXI століття»: Матеріали XVI Всеукраїнська наук.-прак. конф. студентів, аспірантів і молодих вчених, м. Київ, 3 червня 2022р., Київ, 2022. С. 155-156

8. Консультанти розділів дисертації

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розроблення стартап проекту	Ткаченко Т.П., к.е.н, доцент	19.10.20 <i>Tkachenko</i>	31.05.22 <i>Tkachenko</i>

9. Дата видачі завдання 19.10. 2020р.

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання магістерської дисертації	Термін виконання етапів магістерської дисертації	Примітка
1.	Визначення предмету дослідження	01.03.22 - 04.03.22	виконано
2.	Характеристика об'єкту	04.03.22 - 10.03.22	виконано
3.	Огляд літератури	11.03.22 - 12.04.22	виконано
4.	Визначення матеріалів і методів	12.04.22 - 15.04.22	виконано

5.	Виконання вирівнювань та розрахунків	16.05.22 - 16.05.22	виконано
6.	Аналіз отриманих результатів	15.05.22 - 24.05.22	виконано
7.	Розроблення стартап проєкту	25.05.22 - 31.05.22	виконано
8.	Оформлення дипломної роботи	31.05.22 - 08.06.22	виконано

Студент



Лілія МІЗЮРКО

Науковий керівник

Світлана ГОРОБЕЦЬ

## РЕФЕРАТ

Магістерська дисертація містить 129 сторінок, 25 таблиць, 21 рисунок, 90 використаних джерел.

Біологічний синтез магнітних наночастинок за допомогою живих організмів, таких як рослини, вищі гриби та мікроорганізми (гриби, віруси, бактерії та актиноміцети). Наночастинки, отримані цим методом використовуються в біомедичній галузі, перевагами цього методу є його ефективність, екологічність та чистота процесу. Пробіотичні мікроорганізми здатні до біомінералізації ідеально підходять для синтезу наночастинок для використання у біомедицині, так як не є патогенними і легкі у культивуванні.

Актуальним є дослідження процесу біомінералізації у пробіотичних мікроорганізмів та дослідження функцій білків біомінералізації для подальших застосувань.

Метою є дослідити білки біомінералізації біогенних магнітних наночастинок у пробіотиків за допомогою методів порівняльної геноміки і розрахувати фізико-хімічні властивості білків біомінералізації біогенних магнітних наночастинок у пробіотиків з використанням пакету `Biopython` мови програмування `python`.

Завданнями є методами порівняльної геноміки визначити здатність до синтезу біогенних магнітних наночастинок (БМН) у обраних пробіотичних мікроорганізмів, методами пакету `Biopython` мови програмування `python` розрахувати фізико-хімічні властивості гомологів `mag`-білків магнітотаксисних бактерій у протеомах пробіотичних мікроорганізмів.

Об'єкт дослідження є протеоми магнітотаксисних бактерій та пробіотичних мікроорганізмів, білки біомінералізації біогенних магнітних наночастинок у пробіотичних мікроорганізмів.

Предмет дослідження – це фізико-хімічні властивості `mag`-білків магнітотаксисних бактерій та їх гомологів у пробіотичних мікроорганізмів, генетичний механізм біомінералізації біогенних магнітних наночастинок у пробіотичних мікроорганізмів.

Було використано методи порівняльної геноміки і методи пакету Biopython мови програмування python для розрахунку фізико-хімічних властивостей білків

Було розраховано фізико-хімічні властивості білків біомінералізації біогенних магнітних наночастинок у обраних магнітотаксисних бактерій. Вперше розраховано фізико-хімічні властивості білків біомінералізації біогенних магнітних наночастинок пробіотиків з використанням пакету Biopython мови програмування python у обраних пробіотиків. Вперше виявлено, які фізико-хімічні властивості білків біомінералізації біогенних магнітних наночастинок пробіотиків співпадають з фізико-хімічними властивостями гомологічних білків магнітотаксисних бактерій.

Результати було опубліковано у Матеріалах III міжнародної науково-практичної конференції і Всеукраїнська науково-практичній конференції студентів, аспірантів і молодих вчених «Біотехнологія XXI століття».

*Ключові слова: біомінералізація, магнітотаксисні бактерії, зелений синтез, біомедицина, адресна доставка ліків, наночастинки, магнітні наночастинки, пробіотичні бактерії, біоінформатика.*

## ABSTRACT

The master's dissertation contains 129 pages, 25 tables, 21 figures, 90 sources used. Biological synthesis of magnetic nanoparticles by living organisms such as plants, higher fungi and microorganisms (fungi, viruses, bacteria and actinomycetes). The nanoparticles obtained by this method are used in the biomedical field, the advantages of this method are its efficiency, environmental friendliness and purity of the process. Probiotic microorganisms capable of biomineralization are ideal for the synthesis of nanoparticles for use in biomedicine, as they are non-pathogenic and easy to cultivate. The study of the biomineralization process in probiotic microorganisms and the study of the functions of biomineralization proteins for further applications are relevant.

The aim is to study the proteins of biomineralization of biogenic magnetic nanoparticles in probiotics using comparative genomics methods and to calculate the physicochemical properties of proteins of biomineralization of biogenic magnetic nanoparticles in probiotics using the Biopython package of the python programming language.

The tasks are methods of comparative genomics to determine the ability to synthesize biogenic magnetic nanoparticles (BMN) in selected probiotic microorganisms;

The object of research is the proteomes of magnetotoxic bacteria and probiotic microorganisms, proteins of biomineralization of biogenic magnetic nanoparticles in probiotic microorganisms.

The subject of research is the physicochemical properties of mam-proteins of magnetotoxic bacteria and their homologues in probiotic microorganisms, the genetic mechanism of biomineralization of biogenic magnetic nanoparticles in probiotic microorganisms.

The methods of comparative genomics and the Biopython package of the python programming language were used to calculate the physicochemical properties of proteins

The physicochemical properties of biomineralization proteins of biogenic magnetic nanoparticles in selected magnetotoxic bacteria were calculated. For the first time, the physicochemical properties of biomineralization proteins of biogenic magnetic nanoparticles of probiotics were calculated using the Biopython package of the python

programming language in selected probiotics. For the first time, it was found that the physicochemical properties of biomineralization proteins of biogenic magnetic nanoparticles of probiotics coincide with the physicochemical properties of homologous proteins of magnetotoxic bacteria.

The results were published in the Proceedings of the III International Scientific and Practical Conference and the All-Ukrainian Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates and Young Scientists "Biotechnology of the XXI Century".

*Key words: biomineralization, magnetotoxic bacteria, green synthesis, biomedicine, targeted drug delivery, nanoparticles, magnetic nanoparticles, probiotic bacteria, bioinformatics.*



## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ ...	11
ВСТУП.....	12
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	16
1.1. Магнітотаксисні бактерії та сфери їх застосування. ....	16
1.1.1. Генетична регуляція біомінералізації БМН .....	19
1.1.2. Магнітотаксисні бактерії як вектори для доставки генів та ліків .....	21
1.2 Пробиотики в нанобіотехнології .....	25
1.2.1 Загальна характеристика пробіотиків .....	25
1.2.2 Біомедичні застосування пробіотиків.....	26
1.2.3 Зелений синтез металевих наночастинок пробіотиками.....	30
1.2.4 Біомінералізація БМН пробіотиками .....	32
2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА .....	34
2.1 Матеріали та методи .....	34
2.1.1 Матеріали досліджень .....	34
2.1.2 Методи порівняльної геноміки .....	34
2.1.3 Методи пакету Віорpython мови програмування python для розрахунку фізико-хімічних властивостей білків .....	36
2.2 Результати та обговорення.....	41
2.2.1 Пошук потенційних продуцентів БМН пробіотичних мікроорганізмів.....	41
2.2.2 Функції гомологів білків магнітосомного геномного кластера у пробіотичних мікроорганізмів.....	45
2.2.3 Класифікація пробіотиків за генетичним механізмом біомінералізації БМН з різним типом внутрішньої будови (кристалічна/аморфна) та локалізацією (внутрішньоклітинна/зовнішньоклітинна) .....	55
2.2.4 Порівняння фізико-хімічних властивостей білків магнітосомного геномного кластера магнітотаксисних бактерій та пробіотичних мікроорганізмів .....	58
3 РОЗРОБКА СТАРТАП ПРОЕКТУ .....	96
3.1 Резюме: конкретизація бізнес ідеї, мети стартапу, об'єкту дослідження, місця розробки у інноваційному ланцюжку цінності.....	96
3.2 Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища стартап-проекту. Ключові фактори успіху.....	100

3.3	Визначення ключових факторів успіху проекту.....	105
3.4.	Визначення потенційних споживачів .....	107
3.5.	Ціна інноваційної пропозиції на ринку .....	109
3.6.	Концепція бізнес-моделі проекту та карта бізнес-процесів реалізації проекту .....	110
3.7.	Ризики стартап-проекту та методи управління ними.....	116
ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ ДО ДИСЕРТАЦІЇ.....		119
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ .....		121

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ

МТБ – магнітотаксисні бактерії;

НЧ – наночастинки;

БМН – біогенні магнітні наночастинки;

МО – магнітосомний острівець;

DOX – доксорубіцин;

GM – ганглезид;

EGFR – епідермічний фактор росту;

ТЕМ – трансмісійний електронний мікроскоп;

АСМ – атомно-силова мікроскопія;

МСМ – магнітно-силова мікроскопія;

NCBI – National Center for Biotechnology Information, Національний центр біотехнологічної інформації;

BLAST – basic local alignment search tool, основний інструмент пошуку локального вирівнювання;

АКЗ – амінокислотні залишки;

ЛЗ – лікарські засоби.

## ВСТУП

**Актуальність.** Найбільш широко для біомедичних застосувань використовується магнітні наночастинки (МНЧ). МНЧ приваблюють дослідників з різних галузей, таких як біологія, біотехнологія, медицина, матеріалознавство, техніка, фізика, екологія, сільське господарство тощо завдяки своїм багатофункціональним властивостям таким як унікальні електричними та магнітними властивості, малий розмір, суперпарамагнетизм, низька токсичність, біосумісність, хімічна стабільність, велике відношення поверхні до об'єму і відповідно висока поверхнева енергія тощо [1].

Біологічний синтез (іншими словами «зелений синтез») є добре відомим методом синтезу МНЧ за допомогою живих організмів, таких як рослини, вищі гриби та мікроорганізми (гриби, віруси, бактерії та актиноміцети). МНЧ, отримані цим методом, є порівняно біосумісними та корисними для застосування в біомедичній галузі [2]. Перевагами цього методу є його ефективність, екологічність та чистота процесу.

При цьому механізми отримання металевих і втому числі магнітних наночастинок мало досліджені, тобто в літературних джерелах зазначається, що «Біологічний синтез є багатообіцяючим методом, який з'явився в останні роки, але механізм утворення МНЧ за допомогою мікроорганізмів і рослин недостатньо вивчений [3, 4]. Одним з механізмів для мікроорганізмів отримання магнітних наночастинок може бути механізм біомінералізації БМН, який є єдиним для архей, прокаріотів і еукаріотів [5, 6].

В даний час важко переоцінити роль пробіотичних мікроорганізмів у житті людини. Пробіотики використовуються для лікування та профілактики захворювань шлунково-кишкового тракту, зміцнення імунітету [7], подолання наслідків антибіотикотерапії [8], для профілактики та лікування пухлинних захворювань [9] у якості векторів при керованій доставці ліків [10]. Зокрема, дослідження показують низка переваг при використанні пробіотичних мікроорганізмів у якості векторів у порівнянні із іншими мікроорганізмами, що можуть мати токсичний вплив на організм [11]. Використання пробіотиків як

векторів доставки ліків має низку переваг, зокрема це неінвазивність пробіотичних культур та специфічна спорідненість деяких пробіотичних мікроорганізмів до пухлинної тканини. Пробіотичні мікроорганізми можуть специфічно націлюватись на пухлину, викликаючи всередині регресію тканин [12].

**Мета даної роботи** – дослідити білки біомінералізації біогенних магнітних наночастинок у пробіотиків за допомогою методів порівняльної геноміки і розрахувати фізико-хімічні властивості білків біомінералізації біогенних магнітних наночастинок у пробіотиків з використанням пакету Biopython мови програмування python.

**Завдання:**

1. Провести огляд літератури стосовно використання магнітотаксисних бактерій і пробіотиків у біомедичній галузі та в області зеленого синтезу наночастинок.
2. Методами порівняльної геноміки визначити здатність до синтезу біогенних магнітних наночастинок (БМН) у обраних пробіотичних мікроорганізмів.
3. Методами пакету Biopython мови програмування python розрахувати фізико-хімічні властивості гомологів mat-білків магнітотаксисних бактерій у протеомах пробіотичних мікроорганізмів.
4. Розробити стартап-проект.

**Об'єкт дослідження:**

- протеоми штамів магнітотаксисних бактерій (МТБ) *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1, *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1, *Candidatus Magnetobacterium casensis*, *Candidatus Magnetoglobus multicellularis* str. Araruama, *Candidatus Magnetococcus massalia*, *Magnetofaba australis* IT-1, *Desulfovibrio magneticus* RS-1, *Magnetospira* sp. QH-2, *Candidatus Magnetobacterium bavaricum*, *Candidatus Magnetomorum* sp. НК-1, *Candidatus Omnitrophus magneticus*;
- протеоми штамів пробіотичних бактерій: *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus. casei* ssp. *casei* ССМ 7088, *Lactobacillus acidophilus* NCFM,



*Pseudomonas stutzeri*, *Brevibacterium casei*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* 10876, *Bacillus licheniformis* DSM 13, *Lactobacillus fermentum* ATCC 14931, *Lactobacillus plantarum* JDM1, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820, *L. acidophilus* 58p B6T7, *Lactobacillus sp. Lact08 from Yoghurt cells*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus isolated from probiotic curd*, *Bacillus subtilis* 168, *Escherichia coli* k12, *L. casei (strain JCM1134)*, *Lactobacillus kimchicus* DCY51T isolated from Korean kimchi, *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 = JCM 1132, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745, *Saccharomyces cerevisiae*;

**Предмет дослідження:** фізико-хімічні властивості тап-білків магнітотаксисних бактерій та їх гомологів у пробіотичних мікроорганізмів, генетичний механізм біомінералізації біогенних магнітних наночастинок у пробіотичних мікроорганізмів.

**Наукова новизна:**

- вперше розраховано фізико-хімічні властивості білків біомінералізації біогенних магнітних наночастинок у магнітотаксисних бактерій (МТБ) *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1, *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1, *Candidatus Magnetobacterium casensis*, *Candidatus Magnetoglobus multicellularis str. Araruama*, *Candidatus Magnetococcus massalia*, *Magnetofaba australis* IT-1, *Desulfovibrio magneticus* RS-1, *Magnetospira sp. QH-2*, *Candidatus Magnetobacterium bavaricum*, *Candidatus Magnetomorum sp. НК-1*, *Candidatus Omnitrophus magneticus*;
- вперше розраховано фізико-хімічні властивості білків біомінералізації біогенних магнітних наночастинок пробіотиків з використанням пакету Віорутон мови програмування python у пробіотиків .....
- Вперше виявлено, які фізико-хімічні властивості білків біомінералізації біогенних магнітних наночастинок пробіотиків ... співпадають з фізико-хімічними властивостями гомологічних білків магнітотаксисних бактерій.

### **Апробація:**

1. Горобець С.В., Кузьмініх Л.В., **Мізюрко Л.А.** Вплив хелату феруму на магнітофоретичну рухливість *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745: Матеріали III міжнародної наук.-прак. Конф., м. Львів, 29-30 червня 2021 р. Львів, 2021. С. 39-41.
2. Горобець С.В., Мізюрко Л.А., Біоінформатичний аналіз білків біомінералізації біогенних магнітних наночастинок у пробіотиків. «Біотехнологія XXI століття»: Матеріали XVI Всеукраїнська наук.-прак. конф. студентів, аспірантів і молодих вчених, м. Київ.

## 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Магнітотаксисні бактерії та сфери їх застосування.

Магнітотаксисні бактерії (МТБ) представляють різноманітну групу грамнегативних рухливих водних мікроорганізмів, які мають здатність біомінералізувати внутрішньоклітинні нанорозмірні магнітні кристали, які називаються магнітосомами, за допомогою контрольованого на генетичному рівні процесу біомінералізації [13]. Ці організми були виявлені на основі їх реакції на магнітні поля, яка називається магнітотаксисом, тобто коли клітини пасивно вирівнюються і пливуть уздовж ліній магнітного поля, що призводить до їх накопичення на краю крапель води в магнітному полі, якщо розглядати їх у мікроскоп [14]. В даний час вважається, що магнітотаксис у поєднанні з хемотаксисом допомагає МТБ знайти оптимальне положення у середовищах з нерівномірними хімічними та окислювально-відновними градієнтами для виживання та розмноження [15]. Відкриття та подальші дослідження МТБ відіграли важливу роль у відповіді на багато важливих питань щодо процесу біомінералізації та еволюції МТБ, а також екологічної ролі, яку ці організми відіграють у природних середовищах існування. Проте протягом багатьох років МТБ та їх магнітосоми також були предметом досліджень щодо їх використання в біотехнологічних, медичних та інших, можливо, комерційних застосуваннях [16].

МТБ та їх магнітосоми були оцінені як біотехнологічні інструменти в багатьох застосуваннях. Найбільш широко магнітосоми використовуються для доставки ліків, у сепарації клітин, в науках про їжу, відновлення/виявлення ДНК та антигенів, гіпертермії, контрастуванні зображень для МРТ, іммобілізації ферментів та біоремедіації ґрунтів тощо, наведено у таблиці 1.1 [17].

Порівняльна таблиця біотехнологічних застосувань клітин магнітотаксисних бактерій (МТБ) та їх магнітосом [17].

Застосування МТБ			
Сфера	Застосування	Переваги	Недоліки
1	2	3	4
Доставка ліків	Наноліпосоми, наповнені лікарськими засобами, прикріплені до клітин для цільового лікування пухлин	Можливість дозування, клітина використовує власний магнітотаксис	Потенційно імуногенний через зовнішній ліпідно-пептидний шар
Біоремедіація	Очищення стічних вод, ґрунтів, атмосфери Видалення важких металів (Cd, Te, Se)	Відновлення видалені мінерали	Поганий ріст МТБ в забрудненому середовищі; Може вплинути на біомінералізацію БМН
Застосування магнітосом			
Доставка ліків	Доставка протипухлинних препаратів: доксорубіцину, цитарабіну, даунорубіцину; доставка протипухлинних генів	Цілеспрямована доставка ліків; зниження дози токсичності препарату; тканинна специфічність; проста функціоналізація;	Подальша доля магнітосом у організмі досі не вивчена; необхідний аналіз на ендотоксини
Сепарація клітин	Сортування клітин крові;	Повторне використання комплексу захоплення; висока специфічність поділу	Складні етапи клонування та експресії зв'язувального білка; зміна життєздатності клітин за рахунок захоплення

			зв'язувальним білком
--	--	--	----------------------

Продовження таблиці 1.1

1	2	3	4
Безпека харчових продуктів	Захоплення клітин <i>Salmonella</i> і <i>Vibrio</i> ; виявлення ентеротоксинів	Повторне використання комплексу захоплення; висока специфічність	Специфічність антитіл, так як для реалізації необхідна процедура зшивання антитіл
Контрастна речовина для МРТ	Діагностичне виявлення пухлин	Може також використовуватися як терапевтичний засіб (при гіпертермії, введенні ліків); висока спорідненість до клітин-мішеней;	Подальша доля магнітосом у організмі досі не вивчена; необхідний аналіз на ендотоксини
Відновлення/ виявлення ДНК/антигену	Захоплення олігонуклеотидів і антитіл; виявлення антигену гепатиту В	Висока чутливість і ефективність відновлення	Складна технологія
Гіпертермія	Лікування пухлин	Менш значущі побічні ефекти, ніж у хіміотерапії та променевої терапії; тканинна специфічність; також може використовуватися як інструмент діагностики	Подальша доля магнітосом у організмі досі не вивчена; необхідний аналіз на ендотоксини
Ферментна іммобілізація	Біоремедиація фосфорорганічних пестицидів; деградація целюлози,	Повторне використання нанобіокатализатора; іммобілізація кількох каталізаторів	Можлива втрата активності ферменту через іммобілізацію



### 1.1.1. Генетична регуляція біомінералізації БМН

Спільним для всіх МТБ є наявність специфічних внутрішньоклітинних структур – магнітосом, які в більшості МТБ складаються з частинок магнітного мінералу магнетиту ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) або грейгіту ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ), укладених у мембранні везикули. Більшість знань про механізм біомінералізації магнетиту отримано з досліджень за участю штамів різних видів *Magnetospirillum*, які утворюють кубооктаедричні кристали розміром 42 нм і розташовані в ланцюжках. *Magnetospirillum gryphiswaldense* виробляє до 60 частинок магнітосом, які подібні до частинок інших видів *Magnetospirillum*.

Через велику кількість заліза, необхідного для біомінералізації магнетиту або грейгіту, МТБ, ймовірно, використовує дуже ефективні системи для засвоєння заліза. Крім наявності заліза, для утворення магнітних наночастинок МТБ необхідні мікроаеробні умови. Клітини *M. gryphiswaldense* не мають магнітокерованих властивостей при вирощуванні в аеробних умовах, але починають виробляти  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , коли концентрація кисню зміщується нижче 2-7  $\mu\text{M}$  (мікро моль) [18].

*M. magnetotacticum* MS-1 вперше був використаний для молекулярно-генетичного дослідження. Було висловлено припущення, що деякі гени цієї бактерії можуть бути експресовані в *E. coli*, елементи транскрипції та трансляції двох мікроорганізмів сумісні, що необхідно для молекулярно-генетичних маніпуляцій. Ген *hesA* (ID: 947170) цього організму був клонований і експресований в *E. coli*. Клонували фрагмент ДНК розміром 2 kb з *M. magnetotacticum* MS-1, який доповнював дефіцит поглинання заліза у мутантів *E. coli* і *Salmonella typhimurium*, у яких відсутній функціональний ген *aroD* (ID: 946210). Вони вказують на те, що ця ДНК розміром 2 kb може регулювати поглинання заліза [19].

Порівняльний аналіз послідовностей *ham* генів з *M. gryphiswaldense* штаму MS-1 і геномів *M. magnetotacticum* дозволив ідентифікувати гомологічні гени в

останніх організмах. Було виявлено, що послідовності та розташування більшості *mag* генів, напрочуд добре збереглися у всіх досліджених магнітотаксисних бактеріях. Більшість ідентифікованих на сьогоднішній день *mag* генів були згруповані і їх можна віднести принаймні до двох різних областей геному. Наприклад, *magA* і *magB* є частиною основного кластеру геному штамів *Magnetospirillum*, що містить 16 генів. Оскільки в бактеріях функціонально пов'язані гени часто розташовані близько один до одного, в роботі [20] зроблено висновок, що сусідні гени, пов'язані з утворенням магнітосом.

Однак функція білка *magA* у формуванні магнітосом досить специфічна і не має однозначної ролі. Делеція *magA* в *M. magneticum* AMB-1 призвела до укорочення ланцюгів магнітосом, і було зроблено висновок, що *magA* необхідний для формування функціональних магнітосомних пухирців. Інше дослідження показало, що втрата *magA* призвела до зміни кількості кристалів, що утворюються на клітину, в той час як формування мембрани магнітосоми не постраждало. Більшість генів, які по суті беруть участь у формуванні магнітосом, згруповані в чотири консервативні кластери генів, присутніх у великій нестабільній області геному, яка називається магнітосомним острівцем (МО) [21]. Хоча розмір і вміст генів МО істотно різняться між видами, цей регіон має спільні характеристики для всіх проаналізованих на даний момент МТВ: він добре збережений; має низький вміст GC; він розташований між двома повторюваними послідовностями; інтеграза присутня у області першої повторюваної послідовності. Динамічний аналіз МО у *M. magneticum* AMB-1 показав, що ця область зазнала бічного переносу генів. Подібні ділянки геному були знайдені в геномах інших МТВ [22].

У міру того, як стали доступними більша кількість послідовностей геномів різних МТВ, були ідентифіковані гени, які, як вважають, беруть участь у формуванні магнітосом. Гени, що відповідають за синтез магнітосом є такими: *magA*, *magA*, *magB*, *magC*, *magD*, *magE*, *magF*, *magG*, *magH*, *magI*, *magJ*, *magK*, *magL*, *magM*, *mag P*, *mag* , *magQ*, *magR*, *magS*, *magT*, *magU*, *magW*, *magX*, *magY*, *mgI462*, *mag12* (*magC*), *mag22* (*magA*), *mm22*, *mms5*, *mms6* (*magD*), *mms7* (*magD*), *mms13* *mms24* (*magA*), *mmsF*, *mpsA*, *bfr1* і *bfr2* [23].

Повідомлялося, що *mamB* і *mamM* є транспортера заліза, делеція *mamB* призвела до втрати везикули, якою, за наявності цього гену, оточені БМН. Стабільність *MamB* залежала від присутності *MamM* шляхом утворення гетеродимерного комплексу. Гени *mms13* (*mamC*), *mms7* (*mamD*), *mms5* (*mamG*) і *mms6*, які часто з'являються у вигляді когерентного генного кластера в МТВ, використовуються для кодування білка *Mms* (для специфічного для магнітних частинок) білку. Кілька досліджень підтвердили, що *Mms6* здатний контролювати морфологію кристалів магнетиту *in vitro*, і нещодавній генетичний аналіз надав переконливі докази подібної функції *in vivo* для цього білку. Повідомлялося, що видалення *mms6* призводило до зменшення розміру кристалів магнетиту та рівня білків *Mms*, які зазвичай пов'язані з біомінералізацією кристалів магнетиту [24].

Дослідники у роботі [21] припустили, що *mamI* і *mamL* є ймовірними генами трансмембранного сегмента. Окремі делеції *mamI*, *mamL* та *mamQ* призвели до втрати мембрани магнітосоми у *M. gryphiswaldense* АМВ-1. Кластер генів *mamXYMO*, який використовується для кодування білка *MamY*. Делеція *mamY* призвела до утворення трохи менших магнітосомних мембран. Коли окремі гени *mamE*, *mamO*, *mamM* і *mamN* були видалені, мутанти утворювали лише ланцюжки порожніх мембран магнітосом.

Делеція *mamK* в *M. gryphiswaldense* АМВ-1 не викликала серйозних дефектів у формуванні магнітосом, але вплинула на розташування магнітосом. Ген *mamJ*, розташований безпосередньо перед *mamK*, використовується для кодування білку, який виконує важливу функцію у формуванні ланцюжка магнітосом. Коли *mamJ* було видалено, асоційовані з магнітосомами актинові нитки не були прикріплені до магнітосом, а магнітосоми були агреговані всередині клітини [25].

### **1.1.2. Магнітотаксисні бактерії як вектори для доставки генів та ліків**

У огляді [26] обговорюється використання МТВ, як «розумних терапевтичних засобів» для ефективної системи доставки ліків та генів, яка спрямована на конкретну ділянку або орган в організмі. Переваги використання

МТБ або магнітосом для доставки полягає в тому, що магнітне поле може бути використане, щоб доставляти ліки або гени до певної мішені в організмі, не впливаючи на інші, нецільові тканини. Штам *Magnetococcus marinus* МС-1 використовувався для транспортування наноліпосом, наповнених лікарським засобом, в гіпоксичні області колоректальних пухлин у мишей, і результати свідчать про покращення терапевтичного ефекту наноносіїв при асоціації з МТБ [27]. Виявилося, що клітини *Magnetococcus marinus* МС-1 були все ще живими та рухливими і проявляли як магнітотаксисну, так і аеротаксисну реакцію після ін'єкції мишам в перитуморальній області, досягаючи більш глибоких ділянок пухлини в порівнянні з пасивними агентами (мікросферами та неживими клітинами). *Magnetococcus marinus* МС-1 є морською бактерією, і не очікувалось, що вона залишиться життєздатною в організмі ссавців. Ще одним несподіваним результатом, представленим іншими науковцями [27], було те, що клітини *Magnetococcus marinus* МС-1 були клінічно «безпечними» і не викликали негативних ефектів при введенні мишам. Це дивно і не очікувано через загальні імуногенні властивості грамнегативної бактеріальної клітинної стінки, тому в роботі [28] відмічено, що для гарантії безпеки необхідно провести детальні дослідження впливу введення МТБ у живі організми. Як відомо МТБ є токсичними, а в деяких випадках і патогенними для людського організму [17].

Використання магнітних наночастинок МТБ, як інструменту для систем доставки ліків і генів, є одним із найбільш вивчених аспектів у нанотехнологіях та біомедицині [29].

Комплекс, що складається з протипухлинного препарату доксорубіцину (DOX) та магнітосом, виділених із штаму *M. gryphyswaldense* MSR-1, був виготовлений із застосуванням глутаральдегіду як зшиваючого агента. У цьому комплексі 1 мг очищених магнітосом зв'язували з 0,87 мг DOX . Зв'язок між поверхнею магнітосоми та DOX виявилася дуже стабільним, і вивільнення препарату з комплексу було подовженим. Протипухлинну активність комплексу магнітосома-DOX досліджували щодо клітинних ліній HL60 та ЕМТ-6 лейкемії людини та раку молочної залози миші, відповідно. Вісімдесят відсотків препарату

залишалося зв'язаним з магнітосою після 48 годин інкубації. Цей результат вказує на те, що цей комплекс не руйнується під час кровообігу, і більшість DOX не вивільняється до того, як комплекс досягне цільової тканини. Крім того, комплекс магнітосома-DOX продемонстрував потужну протипухлинну активність, що проявляється у пригніченні росту ракових клітин. Не було втрати протипухлинної активності через будь-які структурні зміни, викликані взаємодією препарату з магнітосою [30].

В інших дослідженнях використовували іммобілізовані на магнітосомах протипухлинні ліки цитарабін і даунорубіцин. Для обох препаратів були протестовані різні протоколи приготування. Для цитарабіну найвища досягнута ефективність інкапсуляції становила 68,4%, що представляє максимальну кількість препарату, ефективно зв'язаного з магнітосомами, тоді як навантаження ліків, визначене як співвідношення між масою препарату, інкапсульованого в наночастинки, і загальною масою наночастинки, досягло 38,9 %. Для даунорубіцину найвища досягнута ефективність інкапсуляції становила 36,1%, тоді як навантаження препаратом досягло піку 17,9% [31]. Коли порівнювали рівні кількості вільного та приєднаного до магнітосоми препарату, протипухлинна активність комплексу цитарабін-магнітосома була подібною до активності вільного препарату. Однак комплекс цитарабін-магнітосома показав довготривалий профіль вивільнення ліків, 40 днів інкубації для 90% вивільненого з комплексу препарату. Така стабільність комплексу означає, що для лікування потрібні менші дози ліків [32].

У дослідженні [33] науковці використали помірну ультразвукову обробку для іммобілізації гангліозидів, які використовуються для лікування клітин карциноми людини в комплексі з магнітосомами. Гангліозиди – це підгрупа гліколіпідів, до складу яких входять вищі жирні кислоти, спирт сфінгозин та вуглеводні компоненти – глюкоза, галактоза, галактозамін.

Найбільша кількість гангліозидів міститься в сірій речовині головного мозку, де вони локалізуються у зовнішніх цитоплазматичних мембранах синаптосом і мікросомах. У рослин і мікроорганізмів гангліозиди відсутні. Розчиняються в



органічних розчинниках і воді. Мають виражені антигенні властивості (зв'язують деякі токсини і нейтралізують їх дію), забезпечують міжклітинні контакти, беруть участь у підтримці іонного гомеостазу в синапсах та утворенні медіаторів. Найбільший вміст гангліозидів у мембранах гангліонарних нейронів. Аномальне накопичення гангліозидів у головному мозку (гангліозидози) внаслідок генетичного дефекту ферментів їх метаболізму супроводжується тяжкими нервово-психічними розладами (хвороба Тея-Сакса).

Ефективність навантаження гангліозидами становила 11,7 та 11,6 мкг для гангліозиду GM1 та GM3, відповідно. Імобілізація GM1 на поверхні магнітосом значно збільшила поглинання гангліозидів клітинами карциноми YTS-1. Імобілізація GM3 посилює інгібування активації рецепторів епідермічного фактору росту (EGFR) у клітинах карциноми людини. Обидва ефекти були більшими при застосуванні магнітного поля в експериментах [34], що вказує на те, що наявність магнітного поля посилює проникнення функціоналізованих магнітосом у клітини.

Крім безпосередньої доставки ліків, магнітосоми використовуються для доставки генів для покращення медикаментозного лікування раку. Науковці [35] нещодавно описали стратегію лікування гепатоцелюлярної карциноми людини (клітини HepG2), в якій магнітосоми були функціоналізовані за допомогою плазміди pVAX1-VA, яка кодує дві протипухлинні молекули, цекропін B і апоптин. Цей підхід призвів до ефективної доставки pVAX1-VA в клітини HepG2 і посилює інгібування пухлини *in vivo* за рахунок підвищення проникності мембрани та активізації каспаз [35].

Цекропіни є антимікробними пептидами. Вперше вони були виділені з гемолімфи *Hyalophora cecropia*, звідки і походить термін цекропін. Цекропіни лізують мембрани бактеріальних клітин; вони також пригнічують поглинання проліну і викликають пошкодження мембран.

Цекропіни складають основну частину вродженої імунної системи комах. Цекропіни – це невеликі білки довжиною від 31 до 37 амінокислот і активні проти грампозитивних і грамнегативних бактерій. Цекропіни, виділені з інших комах,

крім *Hyalophora cecropia* (*Cecropia molt*), отримали різні назви, такі як бактерицидин, лепідоптерин і саркотоксин.

Університет Каліфорнії представив мікроскопічну капсулу, яка пригнічує ракові клітини, при цьому, не шкодячи здоровим, пише MedDaily з посиланням на The Times of India. Капсули створені з розчинного у воді полімеру. У ній розміщено білковий комплекс, який доставляється прямо в ядра ракових клітин.

Цей комплекс включає апоптин, який ініціює смерть пухлини. Він виділений із пташиного вірусу анемії. Коли білок накопичується у ядрі клітини, вона саморуйнується. Розмір капсули сягає приблизно 100 нм. Оболонка розсмоктується без шкоди для організму у здорових клітинах.

Як запевняють вчені, процес не загрожує генетичними мутаціями, на відміну від генних протиракових терапій, і не вбиває здорові клітини як хіміотерапія, яка не робить відмінностей у цьому сенсі.

Це новий підхід до лікування раку, йдеться у повідомленні. Без ефективного транспортного засобу доставити вбивчий білок досить важко. Принаймні тести з мишами, яким вводили клітини раку людини, показали значне скорочення росту пухлин [36].

## **1.2 Пробіотики в нанобіотехнології**

### **1.2.1 Загальна характеристика пробіотиків**

Пробіотик – це латинське слово зі значенням «для життя». Ферментовані продукти, які включають сир, хліб, вино, пиво та кефір, широко використовувалися за їх харчові та терапевтичні переваги задовго до виявлення пробіотиків [37]. Живі мікроорганізми, які надають кілька сприятливих впливів на свого господаря за умови належної кількості, називають пробіотиками. Це широке визначення включає препарати, що містять пробіотики, звичайні продукти харчування, медичні продукти харчування, дієтичні добавки, дитячі суміші, корми для тварин. Природна мікробіота кишечника складається з більшості пробіотиків, зокрема

молочнокислих бактерій і в тому числі *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Weisella*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Enococcus*, *Pedicicscherichiacoccus*, *Pedicoccus*, *Pedicobacic*, *Saccharomyces*. Варто відзначити, що не всі мікроорганізми одного виду мають однакові характеристики і можуть мати різний вплив на організм, крім того, не всі штами одного роду є пробіотичними [38].

При виборі пробіотичних препаратів повинні відбиратися штами мікроорганізмів, що відповідають визначеним вимогам. Вони зводяться до наступного [39, 40]:

- безпечні для організму;
- здатні виробляти корисні метаболіти, такі як органічні кислоти і бактеріоцини;
- наявність антагоністичних властивостей до патогенної та умовно-патогенної мікрофлори;
- стійкість до літичних ферментів слини (лізоцим), травних ферментів (пепсин, ліпаза), до дії шлункового соку і до жовчі;
- стійкість до антибіотиків;
- генетично безпечні;
- вища порівняно з мікрофлорою хазяїна питома швидкість росту пробіотичних культур, що дозволяє їм збільшити продуктивність клітин;
- позитивна імуномодельююча дія.

### **1.2.2 Біомедичні застосування пробіотиків**

Застосовують пробіотики у профілактиці або лікуванні різних захворювань. Пробиотики беруть участь у різних процесах травної системи, таких як травлення, метаболізм, вроджений імунітет епітеліальних клітин, знешкодження патогенів. Показано сприятливий вплив кишкових мікроорганізмів, що виробляють нетоксичні метаболіти, у різних харчових і клінічних аспектах. Пробиотики та ферментовані неперетравлювані харчові продукти, пребіотики, працюють разом і

мають кілька корисних характеристик, таких як антипатогенність, протизапальна, протидіабетична дія тощо [41]. Пробиотики також беруть участь у імунних процесах, таких як посилення реакції антитіл і пригнічення проліферації мононуклеарних клітин. Пробиотики використовуються для лікування різноманітних шлунково-кишкових проблем, включаючи синдром подразненого кишечника, запор, виразковий коліт та некротичний ентероколіт [42]. Пробиотики можуть бути корисними при аутоімунних захворюваннях, включаючи ревматоїдний артрит, системний червоний вовчак і розсіяний склероз. Пробиотики також корисні при високому рівні холестерину в сироватці крові, алергії, вульвовагінальному кандидозі, ВІЛ та онкології [43, 44].

Загалом, пробиотики безпечні. Хоча у пацієнтів із імунодефіцитом або при тяжкому стані пацієнта, слід дотримуватися запобіжних заходів. Висип, гикавка, нудота, запор і метеоризм є одними з найбільш поширених побічних ефектів. Існують інші побічні ефекти, такі як системні інфекції, порушення метаболічної активності та перенесення шкідливих генів, таких як стійкість до антимікробних агентів [9]. У деяких рідкісних випадках використання *Lactobacillus* призводило до абсцесу печінки, сепсису та ендокардиту. Існують дані, які вказують на те, що *Bacillus subtilis* може викликати холангіт, бактеріємію та сепсис [45]. Також повідомляється, що *S. bouvardii* може призвести до грибкового сепсису [46]. Загалом ризик інфекції, пов'язаний з пробіотиками, такий самий, як і ризик інфікування бактеріями мікробіоти людини, тобто негативний вплив виникає при зниженні або відсутності імунітету [47]. Однак переваги пробіотиків переважають ризику.

Прогрес методів скринінгу, заснованих на нанотехнологіях, привів до цільових схем розробки ліків, які підвищують рівень виживання хворих на онкологічні захворювання. Терапевтичні засоби стають високоспецифічними і мають високу спорідненість до різних молекулярних мішеней, залежно від генотипу та фенотипу злоякісної пухлини. Стратегії лікування раку включають широкий спектр комбінованих хімотерапевтичних препаратів, на додаток до променевої терапії. Основними недоліками хімотерапії є небажані побічні ефекти. Тому проводяться

інтенсивні дослідження з метою розробки нової терапевтичної форми з використанням специфічних наночастинок (НЧ) для цілеспрямованої доставки ліків, щоб уникнути цитотоксичного впливу на здорові клітини [48].

Системи доставки ліків на основі НЧ демонструють чудовий прогрес завдяки їх здатності мати «резервуар із контрольованим вивільненням», який може безпечно доставляти терапевтичні засоби до місць пошкодження або конкретних клітин. Для безпечного використання в медицині НЧ повинні бути біосумісними, тобто здатними інтегруватися в біологічну систему, не викликаючи імунної відповіді або негативних побічних ефектів, коли така конструкція з ліками виділяється безпосередньо в пухлину або в кров. НЧ також повинні забезпечувати контрольоване вивільнення ліків, збільшуючи захист терапевтичного засобу та час циркуляції і, таким чином, знижуючи токсичність для здорових клітин [49].

Основним пробіотиком, який використовується в поєднанні з нанотехнологіями для загоєння ран є поліциклічний пептид, що продукується *Lactococcus lactis* та має назву нізин. Нізин був прищеплений до наночастинок на основі вуглеводів, гідроксипропілхітозану. Хітозан був використаний для успішного інкапсулювання нізину з ефективністю захоплення 95% [50]. Доведено, що він ефективний проти шкірних інфекцій, спричинених *S. aureus*, і запобігає утворенню біоплівки. Крім того, було також досліджено кон'югацію нізину з НЧ срібла в нановолокнах. Результати полягали в тому, що він пригнічував широкий спектр грам-позитивних і грам-негативних бактерій протягом тривалого періоду часу. Контрольоване вивільнення пробіотиків, які забезпечують наночастинок та нановолокна, має вирішальне значення для контролю інфекції [51]. Антибактеріальні властивості бактеріоцинів, укладених у наноліпосоми, також показали хороші результати. Пробиотики є багатообіцяючими синергічними компонентами для НЧ, що використовуються в даний час, щоб подолати надзвичайну стійкість бактерій, але в моделях інфекції хірургічних ран, пробіотики досліджувалися в основному *in vitro*. Таким чином, використання пробіотиків кон'югованих з НЧ в дерматологічних цілях вимагає подальших випробувань на людях [52].

У розробці системи доставки ліків на основі бактерій найважливішим є вибір бактеріального штаму зі специфічними характеристиками для націлення на область пухлини. До цього часу для боротьби з пухлинами використовувалися різні штами бактерій, зокрема *Escherichia coli*, *Clostridium*, *Listeria monocytogenes*, *Serratia marcescens*, МТБ та *Salmonella typhimurium*. Зазначені вище бактерії в основному поділяються на два типи. Один з них полягає в тому, що патогенні або ослаблені бактерії самі діють як терапевтичні засоби, завдяки сильній імунній стимуляції. Інший – ослаблені або непатогенні бактерії, які в основному діють як носії протипухлинних засобів лікування [53].

У 1891 році В. Буш несподівано виявив значне зменшення пухлини після інфікування *Streptococcus pyogenes* у пацієнтів з саркомою. Натхнений цим феноменом, лікар вперше очистив і приготував змішану бактеріальну вакцину (інактивовані *Serratia marcescens* і *Streptococcus pyogenes*), яка лікувала тисячі пацієнтів з різними пухлинами і здебільшого показала ефективне пригнічення пухлин. Однак імунна відповідь більшості вакцин на основі бактерій не є довготривалою і зазвичай супроводжується поганою селективністю та серйозними побічними ефектами. Поступово генетично модифіковані та атенуйовані патогенні бактерії були розроблені для більш безпечного та тривалого застосування [54].

На додаток до вищезазначених патогенних бактерій або ослаблених патогенних бактерій, деякі непатогенні бактерії або пробіотики у тому числі *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* і *E. coli* Nissle 1917 також використовувалися в протипухлинних дослідженнях. Однак, з доклінічних і клінічних результатів, усі патогенні бактерії або ослаблені патогенні бактерії після генетичної модифікації викликали лише недостатню супресію пухлини, але не могли повністю знищити пухлини. Серед непатогенних бактерій в протипухлинних дослідженнях *E. coli* Nissle 1917 була використана першою. На відміну від інших генномодифікованих бактерій, *E. coli* Nissle 1917 експресує циклічні динуклеотиди, що продукують фермент діаденілатциклазу під дією якого, активується експресія генів інтерферону локально в пухлині, що дає додатковий і звичайно значно ширший набір інструментів для генетичних маніпуляцій [55].

Інтеграції живих бактерій з абіотичними системами, такими як НЧ дозволяє їм працювати одночасно, досягаючи більш високого рівня функціональності, що перевищує той, який досягається кожним компонентом окремо, розширюючи протипухлинне застосування бактерій. Відомо, що при системних ін'єкціях, таких як внутрішньовенне введення пробіотиків, в організмі можуть виникати проблеми пов'язані з розвитком серйозних системних запальних реакцій та імунною відповіддю організму. Тому інтеграція живих бактерій з абіотичними системами забезпечує «захисну» стратегію для подолання системного запалення. Більше того, такий біогібрид використовує навігацію цільових бактерій для доставки біомедичного вантажу до пухлинної тканини. З одного боку, біогібрид може служити для забезпечення більш широкого потенційного застосування в різноманітних терапевтичних комбінаціях, точно регулюючи типи лікарських препаратів, таких як хіміотерапевтичні препарати, фотодинамічні препарати або імунотерапевтичні препарати. Після цільової доставки лікарських препаратів кон'югованих з НЧ до пухлини, можливе їх вивільнення локально всередині пухлини для гарантування максимальної ефективності і зменшення побічних ефектів [56].

### **1.2.3 Зелений синтез металевих наночастинок пробіотиками**

Метод біологічного синтезу або зелений синтез є добре відомим методом синтезу НЧ, в тому числі магнітних наночастинок за допомогою живих організмів, таких як рослини, гриби та мікроорганізми (мікрогриби, віруси, бактерії, дріжджі). МНЧ отримані цим методом, є порівняно біосумісними та корисними для застосування в біомедичній галузі. Біологічний метод обирають через його екологічність, економічність, стійкість, відтворюваність та високу продуктивність [57].

Підходи до зеленого синтезу забезпечують стійкий, економічний і менш жорсткий метод синтезу НЧ порівняно з хімічними або фізичними методами. Крім того, біологічний синтез забезпечує контроль

над розмірами і формою для необхідних застосувань. Зараз добре відомо, що багато організмів можуть виробляти неорганічні матеріали внутрішньоклітинно або позаклітинно. На сьогодні такі організми, як бактерії, в тому числі актиноміцети, гриби, дріжджі, віруси та водорості, досліджуються як відновники або стабілізуючі агенти для синтезу НЧ металів, таких як золото, срібло, мідь, кадмій, платина, паладій, титан, залізо і цинк, які знаходять застосування в промислових та біомедичних галузях [58].

При цьому механізми отримання металевих і в тому числі магнітних НЧ мало досліджені, тобто в літературних джерелах зазначається, що біологічний синтез є багатообіцяючим методом, який з'явився в останні роки, але механізм утворення МНЧ за допомогою мікроорганізмів і рослин недостатньо вивчений і для нього важко підбирати бактерії [58].

Бактерії мають здатність відновлювати іони металів і є хорошими кандидатами для отримання НЧ. Для отримання металевих та інших НЧ використовуються різноманітні види бактерій. Деякі приклади бактеріальних штамів, які широко використовувалися для синтезу НЧ з чіткою морфологією розміру/форми, включають: *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei*, *Bacillus cereus*, *Aeromonas sp.* SH10 *Phaeocystis antarctica*, *Pseudomonas proteolytica*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus indicus*, *Bacillus cecembensis*, *Enterobacter cloacae*, *Geobacter sp.*, *Arthrobacter gangotriensis*, *Corynebacterium sp.* SH09 *Shewanella oneidensis* тощо. Так, для отримання НЧ золота було використано кілька видів бактерій (таких як *Bacillus megaterium* D01, *Desulfovibrio desulfuricans*, *E. coli* DH5a, *Bacillus subtilis* 168, *Shewanella algae*, *Rhodopseudomonas capsulatus*, *Plectonema boryanum* 485 [59].

Продуктування НЧ з використанням грибів є ще одним біологічним методом синтезу НЧ. Гриби мають високий потенціал зв'язування клітинної стінки з іонами металів і мають більший потенціал накопичувати значні концентрації металів; отже, гриби можуть давати більшу кількість НЧ, ніж бактеріальні клітини [60]. Виробництво НЧ за допомогою грибів є більш ефективним і недорогим, ніж за допомогою бактерій, оскільки обробка біомаси грибів та подальша їх переробка є простішими в біосинтезі НЧ. Тому гриби широко вивчаються для синтезу різних



НЧ, таких як срібло, золото тощо. В останні кілька років показано, що максимальна ефективність була отримана при позаклітинному синтезі НЧ з використанням грибів, при якому не використовуються хімічні препарати; фізичні факторів, наприклад, такі як ультразвук тощо [61].

Використання пробіотичних мікроорганізмів для виробництва наночастинок, в тому числі МНЧ, є екологічно чистим, а також комерційно привабливим підходом. Це пов'язано з меншим споживанням енергії, екологічністю, низькими витратами, масштабованістю та стабільністю МНЧ порівняно з використанням методів хімічного синтезу. Непатогенність пробіотиків і їх здатність швидко рости, регулюючи експресію генів для виробництва різних білків і ферментів, які беруть участь у виробництві МНЧ, є корисними способами. *Lactobacillus* і *Bifidobacterium* – найпопулярніші пробіотики, що містяться в молочних продуктах і природній флорі, які є непатогенними грампозитивні бактеріями і використовуються у виробництві широкого спектру НЧ: Ti, Ag, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Au, Zn тощо [62].

#### **1.2.4 Біомінералізація БМН пробіотиками**

У 2010 в роботі [63] описано отримання за допомогою молочнокислої бактерії *Lactobacillus sp.* наночастинок діоксиду срібла та титану. Синтез проводили при кімнатній температурі в лабораторних умовах, було отримано окремі наночастинки розміром 10-25 нм (Ag) і 10-70 нм (TiO). Також 2010 р., але іншими науковцями [64] було продемонстровано синтез наночастинок оксидів металів Cu і Zn за допомогою *Streptomyces sp.* VITMK1, які були ізольовані з мангрових зарослей в Індії.

У 2012 році в роботі [65] описано синтез наночастинок оксиду срібла за допомогою *Lactobacillus mindensis*. За допомогою ТЕМ-аналізу (трансмісійний електронний мікроскоп) визначали наявність стабільних наночастинок оксиду срібла розміром у діапазоні 2-20 нм.

Також у 2012 р. науковцями в роботі [66] описано синтез НЧ Ag за допомогою *Aspergillus niger*. Реакція відбувалася при температурі навколишнього середовища

за кілька годин. Отримані НЧ срібла охарактеризовано за допомогою TEM-аналізу та рентгеноструктурного аналізу. Синтезовані НЧ являли собою полідисперсні сферичні частинки розміром від 1 до 20 нм. Крім того оцінювався антимікробний потенціал НЧ срібла та показано, що синтезовані НЧ можуть ефективно пригнічувати різні патогенні мікроорганізми, включаючи бактерії та гриби. Досліджено також бактеріальний штам *Escherichia coli* дикий тип, для біосинтезу НЧ срібла [67].

У дослідженні [68] повідомляється про синтез наночастинок срібла штамом бактерії *Bacillus* CS 11, виділеним із забрудненого важкими металами ґрунту. При обробці бактерій розчином  $\text{AgNO}_3$  було виявлено, що вони мають здатність утворювати НЧ срібла позаклітинно при кімнатній температурі протягом 24 годин, аналіз наночастинок за допомогою TEM показав, що розмір наночастинок становить 42-92 нм.

В роботі [66] повідомляється про синтез пробіотичною бактерією *Lactobacillus Sporogenes* НЧ  $\text{ZnO}$ . Синтез проводили при кімнатній температурі, для визначення утворення наночастинок  $\text{ZnO}$  проводили TEM-аналіз та рентгеноструктурний аналіз, який показав, що наночастинки  $\text{ZnO}$  мають гексагональну структуру елементарної комірки та розміри 5-15 нм.

Таким чином біологічний метод отримання НЧ із можливістю контролювати розмір і форму наночастинок, що утворюються, стає на сьогодні центром уваги сучасних нанотехнологій.

## 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

### 2.1 Матеріали та методи

#### 2.1.1 Матеріали досліджень

Для проведення біоінформаційного аналізу обрано протеоми наступних пробіотичних мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus casei ssp. casei* CCM 7088, *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Pseudomonas stutzeri*, *Brevibacterium casei*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* 10876, *Bacillus licheniformis* DSM 13, *Lactobacillus fermentum* ATCC 14931, *Lactobacillus plantarum* JDM1, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820, *L. acidophilus* 58p B6T7, *Lactobacillus sp. Lact08 from Yoghurt cells*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus isolated from probiotic curd*, *Bacillus subtilis* 168, *Escherichia coli* k12, *L. casei (strain JCM1134)*, *Lactobacillus kimchicus* DCY51T isolated from Korean kimchi, *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 = JCM 1132, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745, *Saccharomyces cerevisiae*.

Також було використано амінокислотні послідовності білків магнітосомного острівця МТБ: *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1, *Candidatus Magnetobacterium casensis*, *Candidatus Magnetoglobus multicellularis str. Araruama*, *Candidatus Magnetococcus massalia*, *Magnetofaba australis* IT-1, *Desulfovibrio magneticus* RS-1, *Magnetospira sp. QH-2*, *Candidatus Magnetobacterium bavaricum*, *Candidatus Magnetomorum sp. НК-1*, *Candidatus Omnitrophus magneticus*.

#### 2.1.2 Методи порівняльної геноміки

Програма BLAST була обрана для порівняння пробіотичних мікроорганізмів з магнітною бактерією *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1. Щоб виявити здатність до утворення БМН у зазначених штамів мікроорганізмів.

Для порівняння обиралися мембранні білки групи Mam (MamA, MamB, MamM, MamO, MamE, MamK, MamP, MamQ, MamI, MamT, MamH, MamN, MamD, MamR,

MamS, MamZ, MamJ, MamL, MamF, MamG, MamW, MamX, MamY і Mms6, MmsF) бактерії *Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1*. Для оцінки гомології порівнювались параметри:

- E-число (expected value, E-value) – очікуване значення, яке представляє кількість різних вирівнювань, пошук яких відбудуться в базі даних випадково. Чим нижче значення E, тим краще вирівнювання [68]; якщо E-число має значення  $\leq 10^{-10}$ , послідовності гомологічні, від  $10^{-10}$  – 0,05 – гомологія можлива,  $\geq 0,05$  – то співпадіння можна вважати випадковим.
- Ident (I) – наскільки дві послідовності мають однакові залишки в одних і тих же положеннях у вирівнюванні, виражається у відсотках. При Ident більш ніж 45%, то білки мають схожу структуру і схожі спільні функції, Ident більше 25%, білки можливо мають гомологію, Ident у межах 18-25%, тоді гомологія можна вважати можливою, при додаткових перевірках [68].
- Length – довжина вирівнювання, для достовірних результатів має становити не менше 100 амінокислотних залишків [69].
- Порівняння функцій білків біомінералізації БМН у досліджуваних пробіотиків та у МТБ *Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1*, генетичний механізм біомінералізації БМН для якої вивчено найбільш докладно. Основні білки біомінералізації БМН, які виявлені у даній роботі у пробіотичних мікроорганізмах, що досліджувалися, наступні: MamA, MamB, MamM, MamE, MamO, MamK. Білки біомінералізації БМН МТБ *Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1* мають наступні функції [70]:
  - MamA – формування кристалічної структури БМН;
  - MamB – і MamM дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Ni, Fe);
  - MamE – є сериною протеазою, впізнавання субстрату;
  - MamO – серинова протеаза;
  - MamK – формування магнітосомних ланцюжків [71].

### **2.1.3 Методи пакету Biopython мови програмування python для розрахунку фізико-хімічних властивостей білків**

Ідентифікація і порівняння біологічної послідовності є невід'ємною частиною біоінформатики. Для цього доступно кілька інструментів, кожен із власними алгоритмами та підходами, наприклад BLAST (можливо, найпопулярніший), FASTA, HMMER та багато інших. Загалом, ці інструменти зазвичай використовують послідовність для пошуку в базі даних потенційних збігів. Зі збільшенням кількості відомих послідовностей (тому зростає кількість потенційних збігів) інтерпретація результатів стає дедалі складнішою, оскільки потенційних збігів можуть бути сотні чи навіть тисячі. Звичайно, про ручну інтерпретацію результатів цих пошуків не може бути й мови. Більше того, часто потрібно працювати з кількома інструментами пошуку послідовності, кожен з яких має власну статистику, умовні умови та формат виведення. Доволі складно, коли потрібно працювати з кількома послідовностями за допомогою кількох інструментів пошуку. Саме для спрощення роботи і підвищення ефективності в біоінформатиці використовується Biopython.

Проект Biopython – це міжнародна асоціація розробників інструментів для обчислювальної молекулярної біології, які вільно доступні на Python (<https://www.python.org>). Це розподілена спільна робота з розробки бібліотек і програм Python, які відповідають потребам поточної та майбутньої роботи в галузі біоінформатики. Python – це об'єктно-орієнтована, інтерпретована, гнучка мова, яка стає все більш популярною для наукових обчислень. Python легко вивчати, має дуже чіткий синтаксис і його можна легко розширити за допомогою модулів, написаних на C, C++ або FORTRAN.

Веб-сайт Biopython (<http://www.biopython.org>) надає онлайн-ресурс для модулів, сценаріїв та веб-посилань для розробників програмного забезпечення на основі Python для використання та досліджень біоінформатики. По суті, мета Biopython полягає в тому, щоб максимально полегшити використання Python для біоінформатики шляхом створення високоякісних модулів і класів для

багаторазового використання. Функції Biopython включають аналізатори для різних форматів файлів біоінформатики (BLAST, Clustalw, FASTA, Genbank), доступ до онлайн-сервісів (NCBI, ExPASy), інтерфейси до поширених і не дуже поширених програм (Clustalw, DSSP, MSMS), стандартний клас послідовності, різні модулі кластеризації, структура даних дерева KD і навіть документація [72].

Для розрахунку характеристик обраних білків МТБ використано наступні методи пакету Biopython [73]:

- `count_amino_acids()` – допомагає знайти кількість амінокислот у білку;
- `get_amino_acids_percent()` – допомагає знайти частку амінокислоти в білку, перевіряє всі 20 амінокислот;
- `count_amino_acids()` – визначає частку амінокислот, але повертає і зберігає словник, а не числове значення;
- `molecular_weight()` – допомагає знайти молекулярну вагу молекули, вимірюється в а.о.м.;
- `aromaticity()` – допомагає знайти відносну частоту трьох ароматичних амінокислот: Фенілаланін, Триптофан, Тирозин, які причетні до синтезу білків;
- `isoelectric_point()` – визначає ізоелектричну точку білку;
- `secondary_structure_fraction()` – повертає список [Helix, Turn, Sheet], це фракції амінокислот, що зазвичай знаходяться у вторинних структурах;
- `instability_index()` – здійснює розрахунок стабільності білків;
- `flexibility()` – допомагає визначити гнучкість білку, гнучкість є важливим параметром, та як впливає на забезпечення функції білку.

Ароматичні сполуки – це ненасичені циклічні та плоскі молекули, які містять ароматичне кільце. Вони мають додаткову стійкість в результаті розташування  $\pi$ -електронів, розташованих вище і нижче площини ароматичного кільця. Ці електрони породжують так звану хмару  $\pi$ -електронів над кільцем [74]. Ароматичність – це хімічна властивість, пов'язана з такими циклічними та площинними сполуками, і приписується цим  $\pi$ -елекtronom, які можуть вільно кружляти навколо кругового розташування атомів, що знаходяться в ароматичних

частинах. Це явище можна розглядати як прояв циклічної делокалізації, яка зустрічається в планарних кільцевих системах, таких як бензол. Плоска грань ароматичного кільця має частковий негативний заряд завдяки цим  $\pi$ -електронам.

Ароматичність – це відносна частота зустрічаємості ароматичних амінокислот: Phe (Фенілаланін)+Trp (Триптофан) +Tyr (Тирозин), розраховується за методом Лобрі і Готьє [75]. Однак, тирозин не тільки ароматична, а і полярна амінокислота; а гістидин хоч і містить ароматичне кільце, згідно з його властивостями класифікується як полярна амінокислота. Взаємодії, що відбуваються між бічними ланцюгами залишків ароматичних амінокислот, називаються ароматично-ароматичними взаємодіями. Ароматичні взаємодії відносно неполярні. Виявлено, що вони відіграють важливу роль у підтримці загальної структури білкових молекул та комплексів білок-ДНК. Взаємодія між ароматичними залишками всередині білка, а також у комплексі білок-ДНК є невід'ємною частиною для належного функціонування молекули білка.

Розрахунок гнучкості білку за методом [76]. Структурна гнучкість білка важлива для каталізу та зв'язування. Параметри гнучкості білка обернено корелюють зі стабільністю білка.

Організація структури білка характеризується конформаційним розташуванням повторюваних структур (вторинні структури, тобто  $\alpha$ -спіралі,  $\beta$ -листи та петлі). Спостереження за організацією білків виявило деякі їх основні властивості, тобто активні центри зазвичай знаходяться в ядрі білка, в якому амінокислотні залишки добре упаковані і переважно гідрофобні, тоді як поверхневі амінокислотні залишки, піддаються впливу розчинника або інших факторів (білок, ДНК), є більш гнучкими, оскільки менш обмежені, ніж білки ядра. Функції білків та механізми їх взаємодії потребують наявності деяких гнучких властивостей, які значно складніші за ці спрощені уявлення. З використанням різних джерел структурних даних та розробкою різних обчислювальних методів стало відомо, що динаміка білків охоплює великий спектр конформаційних змін (у поєднанні з рухливістю жорсткого фрагмента та деформацією білкового каркасу), включаючи наявність внутрішньої неупорядкованої області тощо. Гнучка структура може дозволити

білку зв'язуватися з багатьма партнерами [77], низька спорідненість до зв'язування з багатьма партнерами, що може характеризуватися високою специфічністю білку [78, 79].

Гнучкість є важливою для виконання функцій білків. Аналіз білкових структур, їх динаміки, достатньо точний і повний опис конформації білкового каркасу можна отримати за допомогою бібліотек невеликих фрагментів білка, які називаються структурними алфавітами Structural alphabets (SAs) та широко використовуються в області аналізу структур білків, динаміки білкових структур, визначенню місць зв'язування лігандів тощо. У поєднанні з різними джерелами експериментальних даних (наприклад, B-фактор) і обчислювальною методологією (наприклад, молекулярно-динамічне моделювання), SA виявляються потужними інструментами для аналізу динаміки білків, наприклад, для дослідження алостеричних механізмів (алостеричний ефект – це зміна поведінки в одній частині молекули, викликана зміною в іншій її частині) у великому наборі структур у комплексах, щоб визначити конформаційні переходи.

Щоб краще оцінити гнучкість амінокислот, в роботі [80] досліджено B-фактори (відображають ступінь теплового руху) з великого набору кристалічних структур з високою роздільною здатністю, враховували B-фактори для кожної амінокислоти в досліджуваному наборі. Було виявлено, що розподіл B-факторів – це розподілом Гамбеля (узагальнений розподіл екстремальних значень). Режим цього розподілу використовувався як оцінка гнучкості для амінокислот. Розподіл Гумбеля є розподілом екстремальних значень як максимальних, і мінімальних вибірок. Використовується для моделювання розподілу пікових рівнів. Наприклад, показує розподіл пікових температур протягом року, якщо існує список максимальних температур протягом 10 років.

На основі режиму розподілу Гумбеля була отримана оцінка гнучкості кожної амінокислоти. Амінокислоти, які зазвичай мають менші B-фактори, матимуть менші режими (іншими словами параметри розташування). Порядок амінокислот за висхідним параметром розташування був WYFCIVHLMAGTRSNQDPEK. Виходячи з цих параметрів розташування, амінокислоти були поділені на дві групи



по 10, де WYFCIVHLMA визначено як жорсткі амінокислоти, а GTRSNQDPEK визначено як гнучкі амінокислоти.

Ізоелектрична точка (pI) – це кислотність середовища pH, за якого молекула певного білка не несе електричного заряду (стає електронейтральною). Чим більше в цьому білку гідроксильних груп (основних залишків), тим вища в нього pI. Білки з pI, меншим за 7, називаються кислотними, а білки з pI, більшим за 7, – основними. Загалом pI білка залежить від функції, яку він виконує. Так, білки, що зв'язуються з нуклеїновими кислотами, часто належать до основних білків. Прикладом таких білків служать гістони.

Розрахунок фракцій вторинної структури білків, при розрахунку метод повертає список фракцій амінокислот, які, як правило, знаходяться у спіралі, повороті або листі:

- Амінокислоти у спіралі (helix): V, I, Y, F, W, L.
- Амінокислоти в повороті (turn): N, P, G, S. Поворот - це елемент вторинної структури білків, де поліпептидний ланцюг змінює свій загальний напрямок.
- Амінокислоти в листі (sheet): E, M, A, L.

Розрахунок стабільності білка. Реалізовано згідно методу Гурупрасад [81]. Цей метод перевіряє стабільність білка. Будь-яке значення вище 40 означає, що білок нестійкий (має короткий період напіввиведення).

За класифікацією Роджерса [82], набір з 32 білків з періодом напіврозпаду *in vivo* > 16 годин брали за клас стабільних білків і набір з 12 білків з періодом напіввиведення *in vivo* < 5 годин вибирали як нестійкий клас білків. Послідовності з цих двох наборів білків аналізували окремо. Частота появи кожної з 20 амінокислот була розрахована у нестабільному, а також стабільному класі білків і порівнювалася з частотою виникнення різних амінокислот у загальній базі даних послідовностей білків PIR. Ці дані явно показують певні помітні відмінності між частотою виникнення різних амінокислот в нестійких і стабільних білках. У разі нестабільних білків амінокислоти Met (M), Gln (Q), Pro (P), Glu (E) та Ser (S) зустрічаються з відносно високою частотою. Гіпотеза PEST, запропонована раніше

Роджерсом та ін. (1986) [83] повідомляє про наявність області, що складається з амінокислот (Pro) P, (Glu) E, (Ser) S і (Thr) T у нестійких білках. Існує також гіпотеза, що Thr (T) не зустрічається більш часто в нестабільних білках порівняно зі стабільними білками, а така амінокислота, як Met (M), більш часто зустрічається в нестабільних білках.

## 2.2 Результати та обговорення

### 2.2.1 Пошук потенційних продуцентів БМН пробіотичних мікроорганізмів

Для виявлення потенційних продуцентів БМН серед наступних пробіотичних мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus casei ssp. casei* CCM 7088, *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Pseudomonas stutzeri*, *Brevibacterium casei*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* 10876, *Bacillus licheniformis* DSM 13, *Lactobacillus fermentum* ATCC 14931, *Lactobacillus plantarum* JDM1, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820, *L. acidophilus* 58p B6T7, *Lactobacillus sp. Lact08 from Yoghurt cells*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus isolated from probiotic curd*, *Bacillus subtilis* 168, *Escherichia coli* k12, *L. casei (strain JCM1134)*, *Lactobacillus kimchicus* DCY51T *isolated from Korean kimchi*, *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 = JCM 1132, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745, *Saccharomyces cerevisiae*, проводилися оцінки ступеня подібності білків протейомів перерахованих пробіотиків з білками біомінералізації БМН МТБ *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1, для якої механізм біомінералізації БМН вивчено докладно. Для виявлення потенційних продуцентів БМН серед досліджуваних пробіотичних мікроорганізмів була використана програма BLAST NCBI, при цьому враховувалися наступні стандартні статистичні показники [84]:

1. Ident (%) – показник, який показує кількість ідентичних амінокислотних залишків білків, що порівнюються. Якщо два білки мають більш, ніж 45% ідентичних залишків, то вони будуть мати дуже схожі структури та з великою ймовірністю однакові чи спільні функції; якщо понад 25% ідентичних

залишків, то, скоріше за все, вони не мають аналогічної структури, проте механізми фолдингу є подібними, тому гомологія білків не є виключеною; ділянки з кількістю ідентичних амінокислотних залишків, що становить 18-24%, визначають як «сумнівна зона», в якій допускається гомологія, але необхідним є проведення її додаткової перевірки [84].

2. E-число – показник, який відображає статистичну значимість вирівнювання, зниження значення якого вказує на менший рівень прояву фактору випадковості при співпадінні амінокислотних залишків білків, які порівнюють. Величина показника E-числа залежить від кількості ідентичних амінокислотних залишків у двох білків та наявності відповідної інформації про амінокислотні послідовності протеому відповідного виду у базі даних.

Якщо значення  $E \leq 0.05$ , то можна стверджувати, що послідовності повністю гомологічні; якщо знаходиться в межах від  $10^{-10}$  –  $10^{-5}$ , гомологія не може бути виключеною; якщо  $E \geq 10^{-5}$ , то співпадіння може мати випадковий характер [84].

3. Length – довжина вирівнювання. Цей показник має бути більше 100 амінокислотних залишків.

Крім стандартних статистичних показників проводилося порівняння функцій mat-білків MO МТБ та білків гомологів MO МТБ в досліджуваних організмах.

Результати вирівнювання між білками біомінералізації БМН, тобто mat-білками МТБ *M. gryphiswaldense MSR-1* та протеомами пробіотичних бактерій наведено в таблиці 2.1.

Вирівнювання між тат-білками МТБ *M. gryphiswaldense* MSR-1 та протеомами  
пробіотичних бактерій

Штам мікроорганізм у	Повнот а Геному	Е-число, Identity (%), Length					
		Білки <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSR-1					
		МамА	МамВ	МамМ	МамО	МамЕ	МамК
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 8325	●	4e-6 23,67% 222	4e-23 25.18% 285	1e-30 29.07% 285	1e-08 30.11% 190	6e-25 40.80% 190	0,002 22,67% 375
<i>Lactobacillus casei ssp. casei</i> CCM 7088	●	1.1 24.59% 879	5e-15 25.40% 314	2e-18 27.20% 314	2e-04 26.74% 442	3e-23 39.77% 442	2e-11 28.08% 329
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	●	0.002 26.19% 214	1e-08 22.81% 299	4e-09 23.08% 299	1e-06 24.40% 423	1e-23 40.51% 412	2e-13 26.67% 334
<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	●	9e-05 26.23% 639	2e-29 28.18% 463	7e-23 28.01% 463	3e-10 29.31% 383	7e-37 46.47% 464	8e-07 25.93% 236
<i>Brevibacterium casei</i>	●	1e-04 25.66% 1295	4e-07 38.24% 328	4e-07 26.39% 327	2e-07 28.57% 337	2e-22 34.74% 337	0.011 23.17% 624
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	●	0.069 22.11% 389	1e-17 27.53% 300	2e-13 22.96% 300	1e-12 28.90% 474	5e-36 40.70% 45	1e-05 24.52% 347
<i>Bacillus cereus</i> 10876	●	5e-06 23.49% 219	6e-36 31.27% 298	1e-32 29.92% 293	6e-06 25.14% 391	2e-25 40.46% 413	2e-09 25.08% 339
<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13	●	2e-07 26.23% 216	3e-30 28.35% 290	5e-31 29.20% 290	1e-04 25.66% 456	1e-28 39.81% 456	1e-11 25.48% 336
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 14931	●	3e-04 27.43% 420	3e-05 24.61% 301	4e-09 26.88% 301	4e-10 28.89% 423	4e-26 40.94% 423	5e-11 23.91% 338
<i>Lactobacillus plantarum</i> JDM1	●	0.20 18.71% 422	2e-05 36.76% 295	1e-07 20.08% 314	2e-06 26.16% 420	2e-26 39.77% 420	1e-12 26.43% 337
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 15820	●	1.7 27.78% 721	2e-15 25.40% 314	8e-19 26.82% 314	8e-04 25.57% 444	1e-21 38.33% 444	3e-11 26.67% 329

Продовження таблиці 2.1

1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Lactobacillus</i> sp . Lact08 from <i>Yoghurt cells</i>	●	0.039 29.20% 422	5e-10 25.00% 303	1e-09 25.91% 303	4e-05 26.74% 420	3e-26 40.91% 420	3e-11 25.07% 333
<i>L. delbrueckii bulgaricus</i> isolated from probiotic curd	●	0.003 23.50% 417	4e-09 24.24% 132	1e-08 24.40% 295	1e-07 25.00% 427	2e-23 42.35% 427	1e-14 27.88% 334
<i>L. acidophilus</i> 58p B6T7	●	1.7 27.78% 721	2e-15 25.40% 314	8e-19 26.82% 314	8e-04 25.57% 444	1e-21 38.33% 444	3e-11 26.67% 329
<i>Bacillus subtilis</i> 168	●	1e-07 25.79% 423	1e-46 33.80% 297	1e-32 29.72% 290	4e-05 21.72% 400	8e-27 38.66% 449	8e-12 25.16% 337
<i>Escherichia coli</i> k12	●	0.003 24.86% 1266	6e-19 28.92% 307	1e-12 22.96% 300	7e-12 28.90% 456	3e-36 39.70% 245	8e-05 24.52% 367
<i>L. casei</i> (strain JCM1134)	●	0.65 23.72% 760	2e-15 25.40% 314	8e-19 26.82% 314	1e-05 26.74% 442	7e-24 39.77% 442	4e-12 28.08% 329
<i>Lactobacillus kimchicus</i> DCY51 T isolated from Korean kimchi	●	5e-05 23.60% 426	3e-06 26.16% 203	8e-04 23.65% 303	6e-04 23.84% 431	3e-23 37.50% 431	3e-12 26.77% 334
<i>Lactobacillus acidophilus</i> DSM 20079	●	0.002 26.19% 210	1e-08 22.81% 299	6e-09 23.08% 299	5e-07 24.40% 412	5e-24 39.41% 412	3e-13 26.67% 334
<i>Saccharomyces boulardii</i> Seguela, Bastide & Massot, 1984	●	8e-05 21.19% 746	8e-16 24.00% 484	2e-14 27.32% 484	9.3 37.21% 284	14 24.66% 676	0.002 40.62% 391
<i>Saccharomyces boulardii</i> CNCM I-745	●	2e-07 17.30% 746	3e-15 26.22% 484	7e-14 26.42% 484	1.4 21.57% 590	0.76 32.76% 523	2e-04 21.64% 375
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C	●	4e-07 18.37% 746	4e-14 28.76% 484	4e-13 29.90% 484	0.30 28.83% 434	0.51 29.36% 523	1e-04 22.67% 360
<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88	●	1.5 41.38% 228	4e-15 23.68% 486	3e-15 24.84% 486	2.9 32.47% 384	1.1 32.14% 238	0.010 24.57% 375

## 2.2.2 Функції гомологів білків магнітосомного геномного кластера у пробіотичних мікроорганізмів

Як зазначалося вище, важливим для встановлення гомології між білками біомінералізації БМН МТБ *M. gryphiswaldense MSR-1* та білками пробіотичних бактерій є функції білків. Назви та функції білків отриманих при їх вирівнюванні в програмі BLAST NCBI наведено у таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Назви та функції білків біомінералізації БМН пробіотичних мікроорганізмів

<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 8325	
МамА	Білок, що містить тетратрикопептидний повтор tetratricoreptide repeat protein [Staphylococcus] формування кристалічної структури БМН
МамВ	Гіпотетичний білок hypothetical protein V070_00851 [Staphylococcus aureus C0673]
МамМ	Гіпотетичний білок hypothetical protein V070_00851 [Staphylococcus aureus C0673]
МамО	Білок, що містить трипсиноподібний домен-пептидазу trypsin-like peptidase domain-containing protein [Staphylococcus aureus] впізнавання субстрату
МамЕ	Білок, що містить трипсиноподібний домен-пептидазу trypsin-like peptidase domain-containing protein [Staphylococcus aureus] впізнавання субстрату
МамК	Актин actin [Staphylococcus aureus] формування магнітосомних ланцюжків
<i>Saccharomyces boulardii</i> Seguela, Bastide & Massot, 1984	
МамА	Субодиниця комплексу/циклосоми, що стимулює анафазу Subunit of the Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome (APC/C) [ <i>Saccharomyces boulardii</i> (nom. inval.)] формування кристалічної структури БМН
МамВ	Передбачуваний транспортер металу, який бере участь у накопиченні заліза в мітохондріях MMT2p putative metal transporter involved in mitochondrial iron accumulation [ <i>Saccharomyces boulardii</i> (nom. inval.)] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамМ	Передбачуваний транспортер металу, який бере участь у накопиченні заліза в мітохондріях MMT2p putative metal transporter involved in mitochondrial iron accumulation [ <i>Saccharomyces boulardii</i> (nom. inval.)]

	дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
--	--

Продовження Таблиці 2.2

МамК	Компонент ARP2p комплексу Arp2/3 ARP2p component of the Arp2/3 complex [ <i>Saccharomyces boulardii</i> (nom. inval.)] формування магнітосомних ланцюжків
<i>Saccharomyces boulardii</i> CNCM I-745	
МамА	Субодиниця комплексу/циклосоми, що стимулює анафазу (APC/C) Subunit of the Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome (APC/C) [ <i>Saccharomyces boulardii</i> (nom. inval.)] формування кристалічної структури БМН
МамВ	Передбачуваний транспортер металу, який бере участь у накопиченні заліза в мітохондріях MMT2p putative metal transporter involved in mitochondrial iron accumulation [ <i>Saccharomyces boulardii</i> (nom. inval.)] дозволяє переносити катіони металів Fe
МамМ	Передбачуваний транспортер металу, який бере участь у накопиченні заліза в мітохондріях MMT2p putative metal transporter involved in mitochondrial iron accumulation [ <i>Saccharomyces boulardii</i> (nom. inval.)] дозволяє переносити катіони Fe
МамК	Компонент ARP2p комплексу Arp2/3 ARP2p component of the Arp2/3 complex [ <i>Saccharomyces boulardii</i> (nom. inval.)] формування магнітосомних ланцюжків
<i>Lactobacillus. casei ssp. casei</i> CCM 7088	
МамВ	Білок сімейства транспортних білків-полегшувачів дифузії катіонів cation diffusion facilitator family transporter [ <i>Lactocaseibacillus casei</i> ] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамМ	Білок сімейства транспортних білків-полегшувачів дифузії катіонів cation diffusion facilitator family transporter [ <i>Lactocaseibacillus casei</i> ] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамО	Білок, що містить трипсиноподібний домен-пептидазу trypsin-like peptidase domain-containing protein [ <i>Lactocaseibacillus</i> ] впізнавання субстрату
МамЕ	Білок, що містить трипсиноподібний домен-пептидазу trypsin-like peptidase domain-containing protein [ <i>Lactocaseibacillus</i> ] впізнавання субстрату
МамК	Білок, що визначає стрижнеподібну форму rod shape-determining protein [ <i>Lactocaseibacillus</i> ] формування магнітосомних ланцюжків

Продовження Таблиці 2.2

<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	
МамА	Білок, що містить тетратрикопептидний повтор tetratricoreptide repeat protein [ <i>Lactobacillus acidophilus</i> ] формування кристалічної структури БМН
МамВ	Білок сімейства транспортних білків-полегшувачів дифузії катіонів cation diffusion facilitator family transporter [ <i>Lactobacillus acidophilus</i> ] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамМ	Білок сімейства транспортних білків-полегшувачів дифузії катіонів cation diffusion facilitator family transporter [ <i>Lactobacillus acidophilus</i> ] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамО	Передбачувана серинова протеаза, пов'язана з тепловим шоком putative heat shock related serine protease [ <i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM] впізнавання субстрату
МамЕ	Передбачувана серинова протеаза, пов'язана з тепловим шоком putative heat shock related serine protease [ <i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM] впізнавання субстрату
МамК	Білок, що визначає стрижнеподібну форму rod shape-determining protein [ <i>Lactobacillus acidophilus</i> ] формування магнітосомних ланцюжків
<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	
МамА	Білок, що містить тетратрикопептидний повтор tetratricoreptide repeat protein [ <i>Pseudomonas stutzeri</i> ] формування кристалічної структури БМН
МамВ	Білок сімейства транспортних білків-полегшувачів дифузії катіонів cation diffusion facilitator family transporter [ <i>Pseudomonas stutzeri</i> ] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамМ	Білок сімейства транспортних білків-полегшувачів дифузії катіонів cation diffusion facilitator family transporter [ <i>Pseudomonas stutzeri</i> ] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамО	Білок, що містить трипсиноподібний домен-пептидазу trypsin-like peptidase domain-containing protein [Proteobacteria] впізнавання субстрату
МамЕ	Периплазматичний рН-залежний попередник серинової ендпротеази DegQ Periplasmic pH-dependent serine endoprotease DegQ precursor [ <i>Pseudomonas stutzeri</i> ] впізнавання субстрату
МамК	Білок, що визначає стрижнеподібну форму rod shape-determining protein [ <i>Pseudomonas stutzeri</i> ]



	формування магнітосомних ланцюжків
--	------------------------------------

Продовження Таблиці 2.2

<i>Brevibacterium casei</i>	
МамА	Білок сімейства CDP-гліцеролгліцерофосфотрансферази CDP-glycerol glycerophosphotransferase family protein [Brevibacterium casei] формування кристалічної структури БМН
МамВ	Білок сімейства транспортних білків-полегшувачів дифузії катіонів cation diffusion facilitator family transporter [Brevibacterium casei] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамМ	Білок сімейства транспортних білків-полегшувачів дифузії катіонів cation diffusion facilitator family transporter [Brevibacterium casei] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамО	Білок, що містить трипсиноподібний домен-пептидазу trypsin-like peptidase domain-containing protein [Brevibacterium casei] впізнання субстрату
МамЕ	Білок, що містить трипсиноподібний домен-пептидазу trypsin-like peptidase domain-containing protein [Brevibacterium casei] впізнання субстрату
МамК	Молекулярний шаперон DnaK molecular chaperone DnaK [Brevibacterium casei] формування магнітосомних ланцюжків
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	
МамВ	Транспортер катіонів CDF family cation-efflux transporter FieF [Enterobacteriaceae] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамМ	Транспортер катіонів CDF family cation-efflux transporter FieF [Enterobacteriaceae] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамО	Серинова протеаза serine endoprotease DegP [Escherichia] впізнання субстрату
МамЕ	Серинова протеаза serine endoprotease DegQ [Enterobacteriaceae] впізнання субстрату
МамК	Білок, що визначає стрижнеподібну форму rod shape-determining protein MreB [Enterobacterales] формування магнітосомних ланцюжків
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C	
МамА	Комплексна субодиниця CDC27, що стимулює анафазу anaphase promoting complex subunit CDC27 [Saccharomyces cerevisiae S288C]

	формування кристалічної структури БМН
МамВ	трансмембранний транспортер катіонів Mmt2p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамМ	трансмембранний транспортер катіонів Mmt2p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамК	Пов'язаний з актином білок 2 actin-related protein 2 [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C] формування магнітосомних ланцюжків
<i>Bacillus cereus</i> 10876	
МамА	Білок, що містить тетратрикопептидний повтор tetratricoreptide repeat protein [ <i>Bacillus</i> ] формування кристалічної структури БМН
МамВ	Система відтоку катіонів Cation efflux system [ <i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамМ	Білок сімейства транспортних білків-полегшувачів дифузії катіонів cation diffusion facilitator family transporter [ <i>Bacillus</i> ] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамО	S1С-сімейство серинових протеаз S1C family serine protease [ <i>Bacillus</i> ] впізнавання субстрату
МамЕ	Білок, що містить трипсиноподібний домен-пептидазу trypsin-like peptidase domain-containing protein [ <i>Bacillus</i> ] впізнавання субстрату
МамК	Білок MreВ, що визначає форму клітини cell shape-determining protein MreВ [ <i>Bacillus</i> ] формування магнітосомних ланцюжків
<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13	
МамА	Білок, що містить тетратрикопептидний повтор tetratricoreptide repeat protein [ <i>Bacillus</i> ] формування кристалічної структури БМН
МамВ	Білок сімейства транспортних білків-полегшувачів дифузії катіонів cation diffusion facilitator family transporter [ <i>Bacillus</i> ] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамМ	Білок сімейства транспортних білків-полегшувачів дифузії катіонів cation diffusion facilitator family transporter [ <i>Bacillus</i> ] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамО	Білок, що містить трипсиноподібний домен-пептидазу trypsin-like peptidase domain-containing protein [ <i>Bacillus</i> ] впізнавання субстрату
МамЕ	S1С-сімейство серинових протеаз S1C family serine protease [ <i>Bacillus</i> ]

	впізнання субстрату
МамК	Білок, що визначає стрижнеподібну форму rod shape-determining protein [Bacillus] формування магнітосомних ланцюжків
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 14931	
МамА	Білок, що містить тетратрикопептидний повтор tetratricopeptide repeat protein [Limosilactobacillus fermentum] формування кристалічної структури БМН
МамВ	Білок сімейства транспортних білків-полегшувачів дифузії катіонів diffusion facilitator family transporter [Limosilactobacillus fermentum] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамМ	Білок сімейства транспортних білків-полегшувачів дифузії катіонів cation diffusion facilitator family transporter [Limosilactobacillus fermentum] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамО	Білок, що містить трипсиноподібний домен-пептидазу trypsin-like peptidase domain-containing protein [Limosilactobacillus fermentum] впізнання субстрату
МамЕ	Білок, що містить трипсиноподібний домен-пептидазу trypsin-like peptidase domain-containing protein [Limosilactobacillus] впізнання субстрату
МамК	Білок, що визначає стрижнеподібну форму rod shape-determining protein [Limosilactobacillus fermentum] формування магнітосомних ланцюжків
<i>Lactobacillus plantarum</i> JDM1	
МамВ	Білок сімейства транспортних білків-полегшувачів дифузії катіонів cation diffusion facilitator family transporter [Lactiplantibacillus] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамМ	Білок сімейства транспортних білків-полегшувачів дифузії катіонів cation diffusion facilitator family transporter [Lactiplantibacillus] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамО	Білок, що містить трипсиноподібний домен-пептидазу trypsin-like peptidase domain-containing protein [Lactiplantibacillus] впізнання субстрату
МамЕ	Білок, що містить трипсиноподібний домен-пептидазу trypsin-like peptidase domain-containing protein [Lactiplantibacillus] впізнання субстрату
МамК	Білок, що визначає стрижнеподібну форму rod shape-determining protein [Lactiplantibacillus] формування магнітосомних ланцюжків
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 15820	
МамВ	Білок сімейства транспортних білків-полегшувачів дифузії катіонів cation diffusion facilitator family transporter [Lacticaseibacillus]

	дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамМ	Білок сімейства транспортних білків-полегшувачів дифузії катіонів cation diffusion facilitator family transporter [Lacticaseibacillus zeae] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамО	Білок, що містить трипсиноподібний домен-пептидазу trypsin-like peptidase domain-containing protein [Lacticaseibacillus] впізнання субстрату
МамЕ	Білок, що містить трипсиноподібний домен-пептидазу trypsin-like peptidase domain-containing protein [Lacticaseibacillus zeae] впізнання субстрату
МамК	Білок, що визначає стрижнеподібну форму rod shape-determining protein [Lacticaseibacillus] формування магнітосомних ланцюжків
<i>Lactobacillus</i> sp. Lact08 from Yoghurt cells	
МамА	Білок, що містить тетратрикопептидний повтор tetratricopeptide (TPR) domain protein [Lactiplantibacillus plantarum] формування кристалічної структури БМН
МамВ	Білок сімейства транспортних білків-полегшувачів дифузії катіонів cation diffusion facilitator family transporter [Lactiplantibacillus plantarum] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамМ	Білок сімейства транспортних білків-полегшувачів дифузії катіонів cation diffusion facilitator family transporter [Lactiplantibacillus plantarum] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамО	Білок, що містить трипсиноподібний домен-пептидазу trypsin-like peptidase domain-containing protein [Lactiplantibacillus] впізнання субстрату
МамЕ	Білок, що містить трипсиноподібний домен-пептидазу trypsin-like peptidase domain-containing protein [Lactiplantibacillus] впізнання субстрату
МамК	Білок, що визначає стрижнеподібну форму rod shape-determining protein [Lactiplantibacillus] формування магнітосомних ланцюжків
<i>L. delbrueckii</i> subsp. bulgaricus isolated from probiotic curd	
МамА	Пептидзв'язуючий білок peptide-binding protein [Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus] формування кристалічної структури БМН
МамВ	Білок сімейства транспортних білків-полегшувачів дифузії катіонів cation diffusion facilitator family transporter [Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамМ	Транспортер катіонів cation transporter [Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамО	Білок, що містить трипсиноподібний домен-пептидазу

	trypsin-like peptidase domain-containing protein [ <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ] впізнання субстрату
МамЕ	Білок, що містить трипсиноподібний домен-пептидазу trypsin-like peptidase domain-containing protein [ <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ] впізнання субстрату
МамК	Білок, що визначає стрижнеподібну форму rod shape-determining protein [ <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ] формування магнітосомних ланцюжків
<i>Bacillus subtilis</i> 168	
МамА	Білок, що містить тетратрикопептидний повтор tetratricopeptide repeat protein [ <i>Bacillus</i> ] формування кристалічної структури БМН
МамВ	Транспортер марганцю MneP manganese transporter MneP [ <i>Bacillus</i> ] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамМ	Білок сімейства транспортних білків-полегшувачів дифузії катіонів cation diffusion facilitator family transporter [ <i>Bacillus</i> ] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамО	Серинова протеаза serine protease HtrC [ <i>Bacillus</i> ] впізнання субстрату
МамЕ	Серинова протеаза serine protease HtrA [ <i>Bacillus</i> ] впізнання субстрату
МамК	Білок MreB, що визначає форму клітини cell shape-determining protein MreB [ <i>Bacillus</i> ] формування магнітосомних ланцюжків
<i>Escherichia coli</i> k12	
МамВ	Транспортер катіонів cation transporter [ <i>Escherichia coli</i> K-12] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамМ	Транспортер FieF витоку катіонів сімейства CDF CDF family cation-efflux transporter FieF [ <i>Enterobacteriaceae</i> ] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамО	Протеази HtrA, що активуються консервативним механізмом, який може бути запущений різними молекулярними сигналами HtrA proteases are activated by a conserved mechanism that can be triggered by distinct molecular cues [ <i>Escherichia coli</i> K-12] впізнання субстрату
МамЕ	Кристалічна структура протеазного домену DegQ з <i>Escherichia coli</i> Crystal structure of the protease domain of DegQ from <i>Escherichia coli</i> [ <i>Escherichia coli</i> K-12] впізнання субстрату
МамК	Білок, що визначає стрижнеподібну форму

	rod shape-determining protein MreB [Enterobacterales] формування магнітосомних ланцюжків
<i>L. casei</i> (strain JCM1134)	
МамВ	Білок сімейства транспортних білків-полегшувачів дифузії катіонів cation diffusion facilitator family transporter [Lacticaseibacillus casei] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамМ	Білок сімейства транспортних білків-полегшувачів дифузії катіонів cation diffusion facilitator family transporter [Lacticaseibacillus casei] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамО	Подібна до трипсину серинова протеаза trypsin-like serine protease [Lacticaseibacillus casei DSM 20011 = JCM 1134 = ATCC 393] впізнання субстрату
МамЕ	Подібна до трипсину серинова протеаза trypsin-like serine protease [Lacticaseibacillus casei DSM 20011 = JCM 1134 = ATCC 393] впізнання субстрату
МамК	Білок, що визначає стрижнеподібну форму rod shape-determining protein MreB [Lacticaseibacillus casei DSM 20011 = JCM 1134 = ATCC 393] формування магнітосомних ланцюжків
<i>Lactobacillus kimchicus DCY51T isolated from Korean kimchi</i>	
МамА	Білок, що містить тетратрикопептидний повтор tetratricopeptide repeat protein [Secundilactobacillus kimchicus] формування кристалічної структури БМН
МамВ	Транспортер катіонів cation transporter [Secundilactobacillus kimchicus] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамМ	Білок сімейства транспортних білків-полегшувачів дифузії катіонів cation diffusion facilitator family transporter [Secundilactobacillus kimchicus] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамО	Білок, що містить трипсиноподібний домен-пептидазу trypsin-like peptidase domain-containing protein [Secundilactobacillus kimchicus] впізнання субстрату
МамЕ	Білок, що містить трипсиноподібний домен-пептидазу trypsin-like peptidase domain-containing protein [Secundilactobacillus kimchicus] впізнання субстрату
МамК	Білок, що визначає стрижнеподібну форму rod shape-determining protein [Secundilactobacillus kimchicus] формування магнітосомних ланцюжків
<i>Lactobacillus acidophilus DSM 20079</i>	

МамА	Білок, що містить тетратрикопептидний повтор tetratricoreptide repeat protein [Lactobacillus acidophilus] формування кристалічної структури БМН
МамВ	Білок сімейства транспортних білків-полегшувачів дифузії катіонів cation diffusion facilitator family transporter [Lactobacillus acidophilus] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамМ	Білок сімейства транспортних білків-полегшувачів дифузії катіонів cation diffusion facilitator family transporter [Lactobacillus acidophilus] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамО	Білок, що містить трипсиноподібний домен-пептидазу trypsin-like peptidase domain-containing protein [Lactobacillus acidophilus] впізнання субстрату
МамЕ	Білок, що містить трипсиноподібний домен-пептидазу trypsin-like peptidase domain-containing protein [Lactobacillus acidophilus] впізнання субстрату
МамК	Білок, що визначає стрижнеподібну форму rod shape-determining protein [Lactobacillus acidophilus] формування магнітосомних ланцюжків
<i>L. acidophilus 58p B6T7</i>	
МамВ	Білок відтоку катіонів cation efflux protein [Lactobacillus acidophilus] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамМ	Білок відтоку катіонів cation efflux protein [Lactobacillus acidophilus] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамО	Передбачувана серинова протеаза, пов'язана з тепловим шоком Putative heat shock related serine protease [Lactobacillus acidophilus CIRM-BIA 445] впізнання субстрату
МамЕ	Передбачувана серинова протеаза, пов'язана з тепловим шоком Putative heat shock related serine protease [Lactobacillus acidophilus CIRM-BIA 445] впізнання субстрату
МамК	Білок, що визначає стрижнеподібну форму rod shape-determining protein MreB [Lactobacillus acidophilus] формування магнітосомних ланцюжків
<i>Aspergillus niger CBS 513.88</i>	
МамВ	Білок відтоку катіонів cation efflux family protein [Aspergillus niger CBS 513.88] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)
МамМ	Білок відтоку катіонів cation efflux family protein [Aspergillus niger CBS 513.88] дозволяє переносити катіони металів (Co, Zn, Cd, Fe)

MamK	Актин actin [Aspergillus niger CBS 513.88] формування магнітосомних ланцюжків
------	---

### 2.2.3 Класифікація пробіотиків за генетичним механізмом біомінералізації БМН з різним типом внутрішньої будови (кристалічна/аморфна) та локалізацією (внутрішньоклітинна/зовнішньоклітинна)

Проведено класифікацію досліджуваних пробіотиків за генетичним механізмом біомінералізації БМН з різним типом внутрішньої будови (кристалічна / аморфна) та локалізацією в клітині (внутрішньоклітинна / зовнішньоклітинна) згідно роботі [85]. Результати представлено в таблиці 2.3.

Таблиця 2.3

Класифікація БМН досліджуваних пробіотиків за типом внутрішньої будови (кристалічна / аморфна) та локалізацією (внутрішньоклітинна / зовнішньоклітинна)

	Зовнішньоклітинні аморфні БМН ( I група)	Зовнішньоклітинні кристалічні БМН (II група)	Внутрішньоклітинні аморфні БМН (III група)	Внутрішньоклітинні кристалічні БМН (IV група)
MamA	—	+	—	+
MamB	+	+	+	+
MamM	+	+	+	+
MamO	—	—	+	+
MamE	—	—	+	+
MamK	—	—	+	+



Отже, досліджені пробіотичні мікроорганізми розділені за типом внутрішньої будови (кристалічна/аморфна) та локалізацією в клітині (внутрішньоклітинна / зовнішньоклітинна), результати представлено в таблиці 2.4.

Таблиця 2.4.

Характеристика досліджені пробіотичні мікроорганізми розділені за типом внутрішньої будови (кристалічна / аморфна) та локалізацією в клітині (внутрішньоклітинна / зовнішньоклітинна)

Зовнішньо-клітинні аморфні БМН	Зовнішньо-клітинні кристалічні БМН	Внутрішньо-клітинні аморфні БМН	Внутрішньо-клітинні кристалічні БМН
<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88	<i>Saccharomyces boulardii</i> Seguela, Bastide & Massot, 1984	<i>Lactobacillus casei ssp. casei</i> CCM 7088	<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 8325
	<i>Saccharomyces boulardii</i> CNCM I-745	<i>Lactobacillus plantarum</i> JDM1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C	<i>L. acidophilus</i> 58 p B6T7	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501
		<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	<i>Brevibacterium casei</i>
		<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 15820	<i>Bacillus cereus</i> 10876
			<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13
			<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 14931
			<i>Lactobacillus</i> sp. Lact08 from Yoghurt cells
			<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> isolated from probiotic curd
			<i>Bacillus subtilis</i> 168
			<i>Escherichia coli</i> k12

			<i>Lactobacillus kimchicus</i> DCY51T isolated from Korean kimchi
			<i>Lactobacillus acidophilus</i> DSM 20079

Проведені біоінформатичні дослідження свідчать, що обрані пробіотичні мікроорганізми є потенційними продуцентами БМН. Згідно отриманих результатів більшість досліджених пробіотичних мікроорганізмів відносяться до потенційних продуцентів внутрішньо-клітинних кристалічних БМН. Наявність процесу біомінералізації у низці досліджених пробіотичних мікроорганізмів підтверджено іншими науковцями. Так відомо, що *Escherichia coli* Nissle 1917 та *Escherichia coli* VKM В-126 є продуцентом внутрішньо-клітинних аморфних БМН(рис 2.1, рис.2.2).

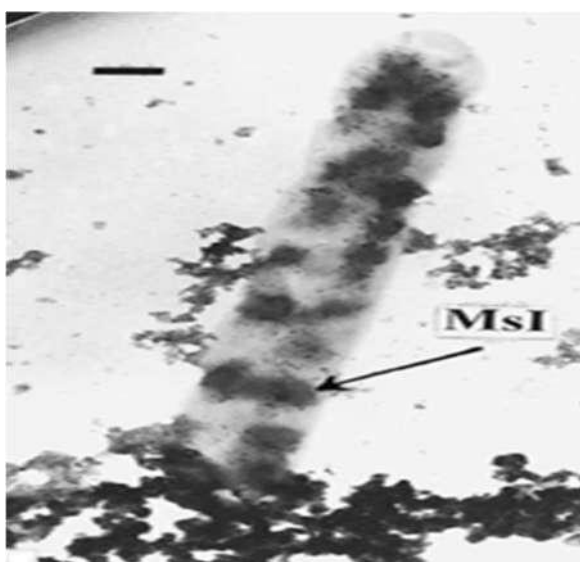


Рисунок 2.1 – TEM БМН у *Escherichia coli* VKM В-126. Bar – 0.5 мкм [86]

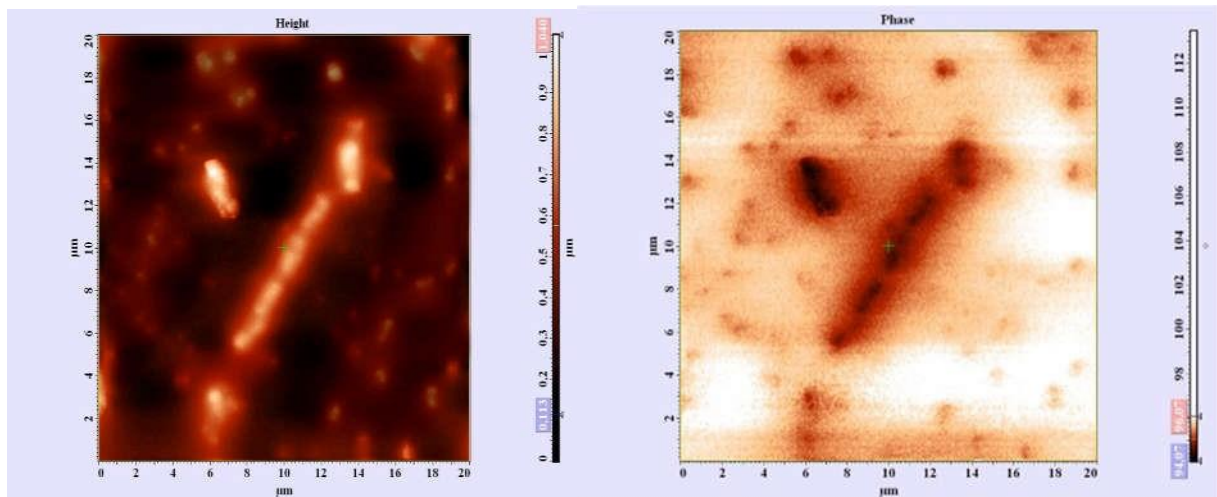


Рисунок 2.2 – АСМ (ліворуч) та МСМ (праворуч) БМН у *Escherichi coli* Nissle 1917. Bar – 0.5 мкм [87]

Крім того, в ряді робіт описано синтез срібних НЧ та інших НЧ за допомогою пробіотичних мікроорганізмів. Так в роботі [58] описано синтез срібних НЧ *Bacillus subtilis* 168, також інші дослідники [88] з допомогою *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745, *Aspergillus niger* [64] та *Lactobacillus plantarum* JDM1 описали синтез НЧ срібла [89] і оксиду цинку [90]. Дані цих робіт узгоджуються з дослідженнями про наявність механізму біомінералізації БМН в цих пробіотичних мікроорганізмах.

#### **2.2.4 Порівняння фізико-хімічних властивостей білків магнітосомного геномного кластера магнітотаксисних бактерій та пробіотичних мікроорганізмів**

Проведені у попередньому розділі дослідження показали, що пробіотичні мікроорганізми *Aspergillus niger* CBS 513.88, *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745, *Lactobacillus plantarum* JDM1 і *Bacillus subtilis* 168 є потенційними продуцентами внутрішньоклітинних кристалічних БМН. Для білків пробіотичних мікроорганізмів, що є гомологами МТБ, важливо визначити властивості, які еволюційно збереглися, а які зазнали змін. Для цього проводиться порівняння фізико-хімічних властивостей білків потенційних продуцентів біогенних магнітних

наночастинки цих пробіотичних мікроорганізмів з білками магнітосомного геномного кластера наступних магнітотаксисних бактерій:

- *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1,
- *Candidatus Magnetobacterium casensis*,
- *Candidatus Magnetoglobus multicellularis* str. Araruama,
- *Candidatus Magnetococcus massalia*,
- *Magnetofaba australis* IT-1,
- *Desulfovibrio magneticus* RS-1,
- *Magnetospira* sp. QH-2,
- *Candidatus Magnetobacterium bavaricum*,
- *Candidatus Magnetomorum* sp. НК-1,
- *Candidatus Omnitrophus magneticus*

З використанням методів пакету Biopython для магнітосомного геномного кластера перерахованих вище магнітотаксисних бактерій та пробіотичних мікроорганізмів, які визначені в даній роботі як потенційні продуценти внутрішньоклітинних кристалічних БМН, були розраховані наступні фізико-хімічні властивості білків біомінералізації БМН:

- молекулярну вагу (molecular weight);
- вміст ароматичних амінокислот Тирозину, Фенілаланіну і Триптофану (aromaticity);
- ізоелектричну точку (isoelectric point) ;
- індекс стабільності білку (instability index);
- фракції амінокислот, що знаходяться у вторинній структурі (secondary structure fraction);
- кількість амінокислотних залишків (count of aminoacids in protein of interest);
- вміст амінокислотних залишків у відсотках (amino acids percent);
- гнучкість білку (flexibility).

Для розрахунку і порівняння гнучкості гомологічних білків пробіотичних мікроорганізмів проводилося множинне вирівнювання білків наступних МТБ:

*Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1, *Candidatus Magnetobacterium casensis*, *Candidatus Magnetoglobus multicellularis* str. Araruama, *Candidatus Magnetococcus massalia*, *Magnetofaba australis* IT-1, *Desulfovibrio magneticus* RS-1, *Magnetospira* sp. QH-2, *Candidatus Magnetobacterium bavaricum*, *Candidatus Magnetomorum* sp. НК-1, *Candidatus Omnitrophus magneticus*.

Порівняння фізико-хімічних властивостей білків магнітосомного геномного кластера магнітотаксисних бактерій та гомологів білків магнітосомного геномного кластера у протеомах пробіотичних мікроорганізмів *Aspergillus niger* CBS 513.88, *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745, *Lactobacillus plantarum* JDM1 і *Bacillus subtilis* 168 представлено на рис. 2.3-2.18. На всіх рисунках червона вертикальна риска означає діапазон зміни відповідних властивостей у МТБ (МТВ), а червона точка – відповідну властивість у досліджуваного пробіотичного мікроорганізму. На всіх рисунках введено наступні позначення (курсивом виділено підписи до рисунку, жирним шрифтом виділено позначення на осях діаграм):

*Molecular weight* – діапазон зміни молекулярної ваги МТБ (МТВ) та молекулярна вага досліджуваного пробіотичного мікроорганізму (**nonМТВ**) (вісь ординат в одиницях а.о.м.);

*Aromaticity* – ароматичність, тобто діапазон зміни відносної частоти зустрічаємості трьох ароматичних амінокислот: фенілаланін, триптофан, тирозин у МТБ (МТВ) та ароматичність досліджуваного пробіотичного мікроорганізму (**nonМТВ**) (вісь ординат);

*Isoelectric point* – діапазон зміни ізоелектричної точки білків МТБ (МТВ) та ізоелектрична точка білку досліджуваного пробіотичного мікроорганізму (**nonМТВ**), тобто значення рН (безрозмірна величина, змінюється від 0 до 14) (вісь ординат);

*Instability index* – діапазон зміни стабільності білків МТБ (МТВ) та стабільність досліджуваного пробіотичного мікроорганізму (**nonМТВ**), безрозмірна одиниця (вісь ординат);

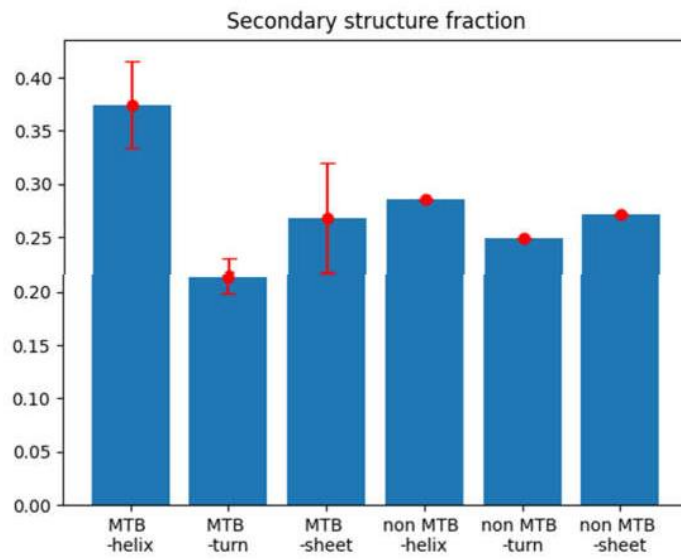
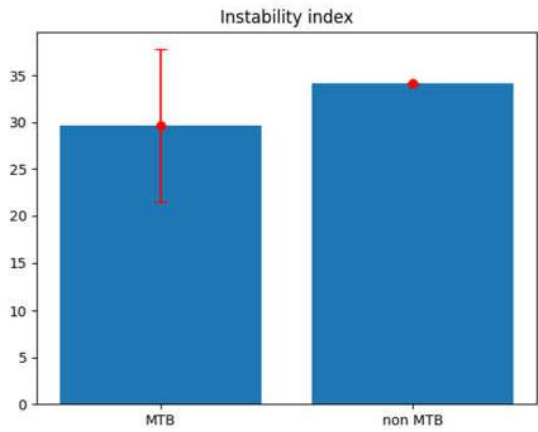
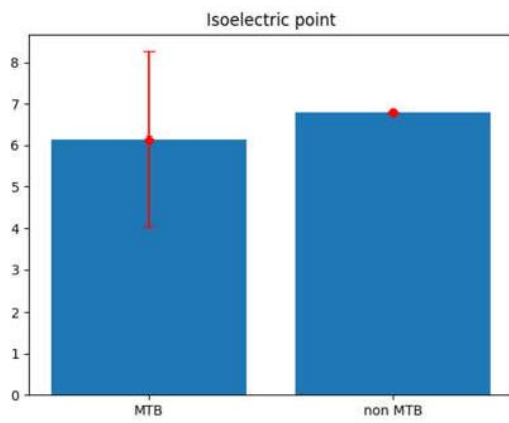
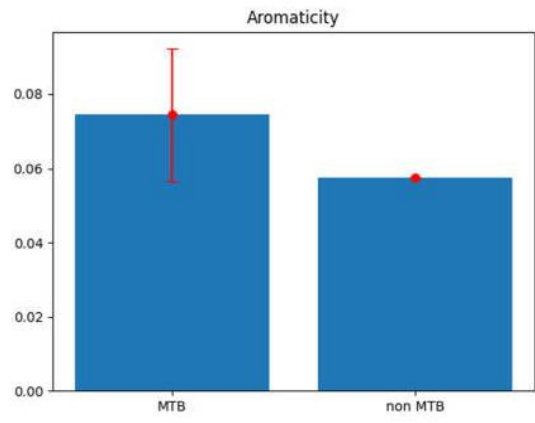
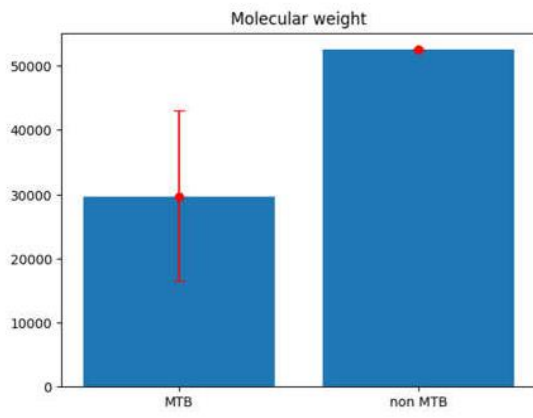
*Secondary structure fraction* – список вторинних структур білків (**Helix, Turn, Sheet**), це частка амінокислот білку, що формують відповідні типи вторинних структур (**Helix, Turn, Sheet**);

*Count amino acids* – діапазон зміни кількості амінокислот у білках МТБ (сині стовпчики діаграм) та кількість амінокислот у білку досліджуваного пробіотичного мікроорганізму (зелені стовпчики діаграм) (вісь ординат), по всім 20 амінокислотам;

*Get amino acids percent* – діапазон зміни частки амінокислоти в білках у білках МТБ (сині стовпчики діаграм) та частка амінокислот у білку досліджуваного пробіотичного мікроорганізму (зелені стовпчики діаграм) (вісь ординат), по всім 20 амінокислотам;

*Flexibility* – діапазон зміни гнучкість білів білків МТБ (фіолетова крива) та гнучкість досліджуваного пробіотичного мікроорганізму (зелена крива), безрозмірна одиниця, (вісь ординат), по осі абсцис – номер позиції у множинному вирівнюванні всіх білків МТБ та білку досліджуваного пробіотичного мікроорганізму.

Порівняння фізико-хімічних властивостей білків магнітосомного геномного кластера магнітотаксисних бактерій та гомологів білків магнітосомного геномного кластера у протеомі бактерії *Aspergillus niger* CBS 513.88 (рис. 2.3, 2.4):



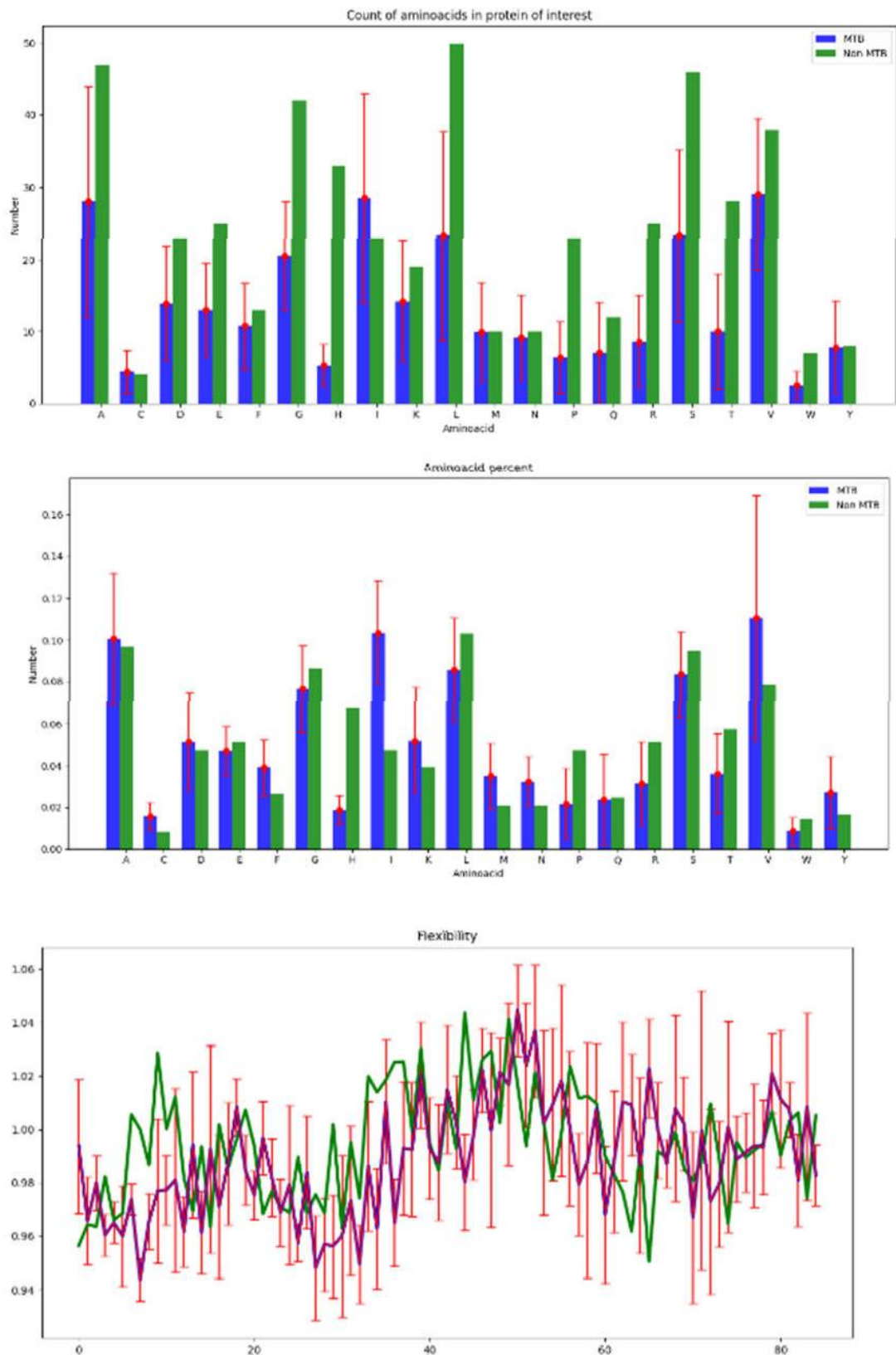


Рисунок 2.3 – Порівняння фізико-хімічних властивостей білку matB магнітосомного геномного кластера магнітотаксисних бактерій та його гомологу



# білків магнітосомного геномного кластера у протеомі бактерії *Aspergillus niger* CBS

513.88

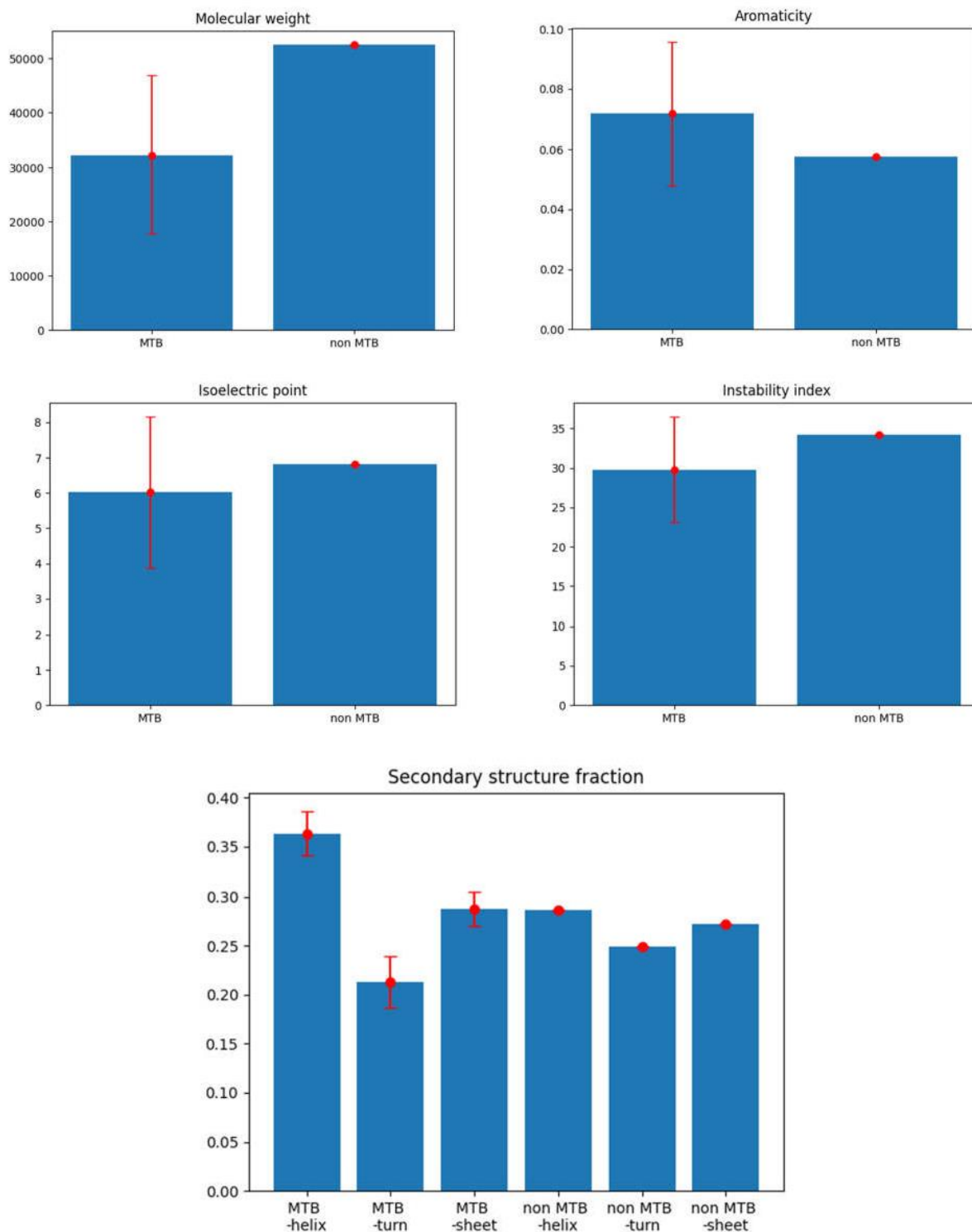
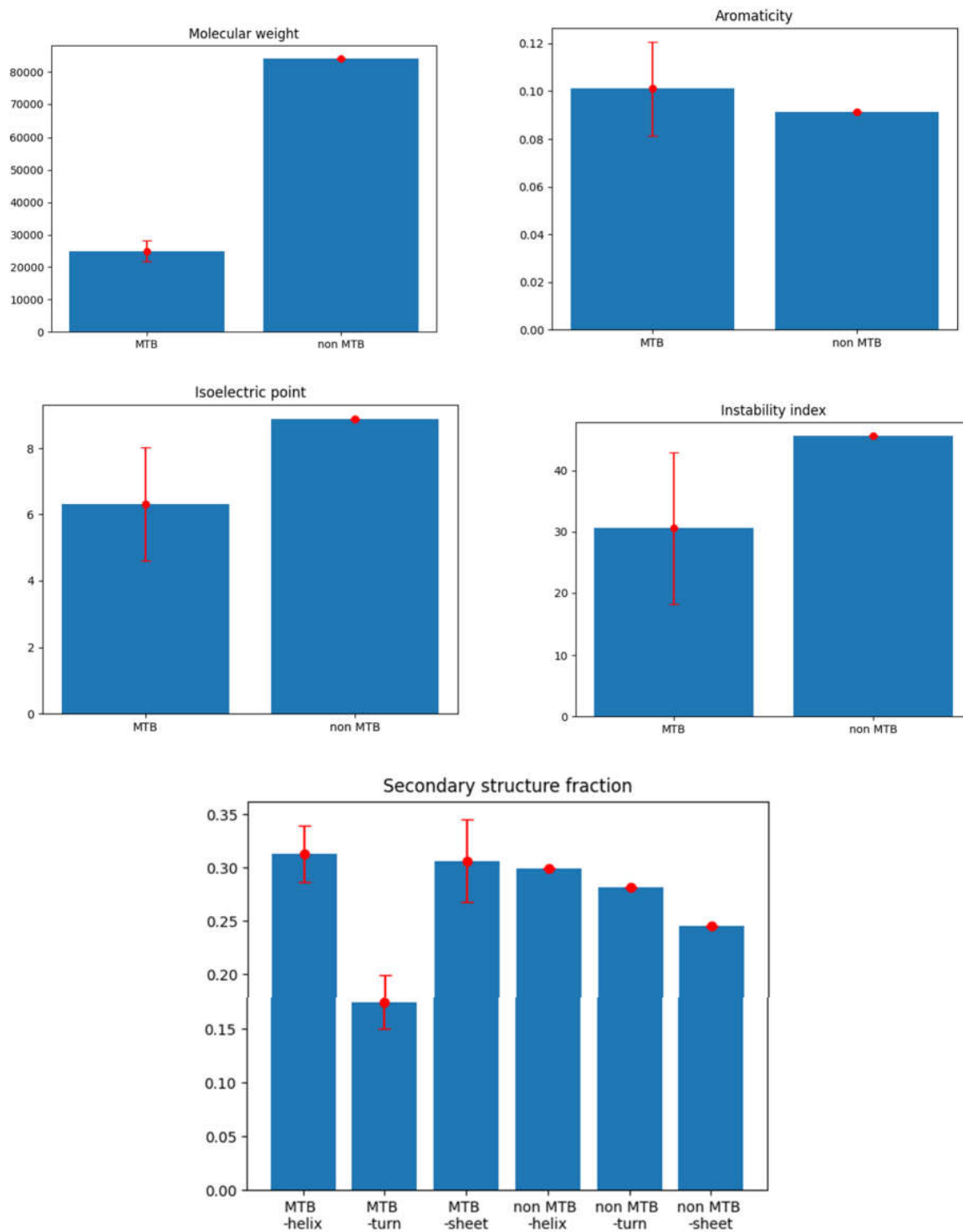




Рисунок 2.4 – Порівняння фізико-хімічних властивостей білку tamM магнітосомного геномного кластера магнітотаксисних бактерій та його гомологу білків магнітосомного геномного кластера у протеомі бактерії *Aspergillus niger* CBS 513.88

Гомологи білків магнітосомного геномного кластера у *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 (рис. 2.5-2.7):



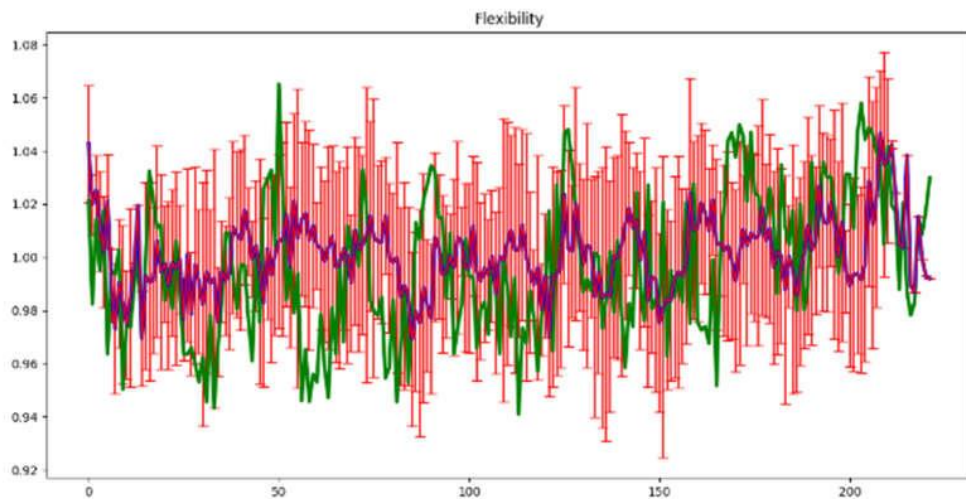
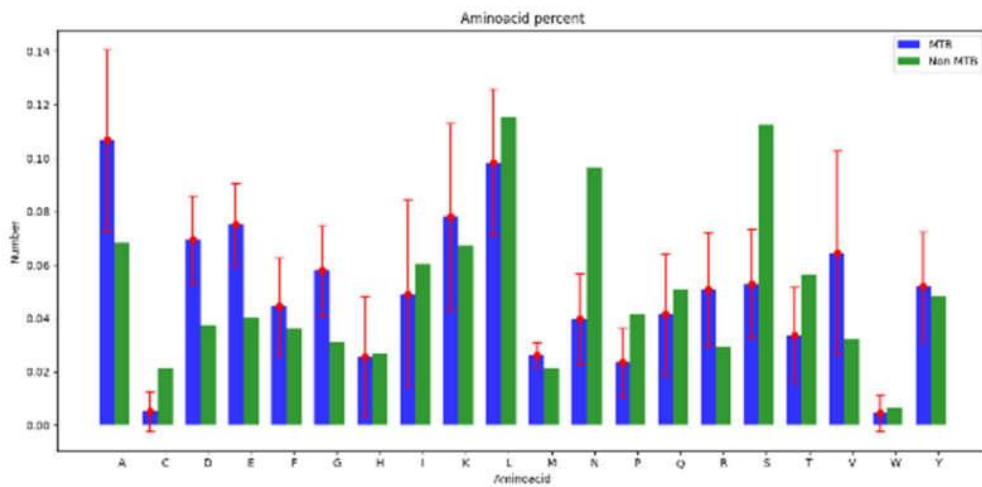
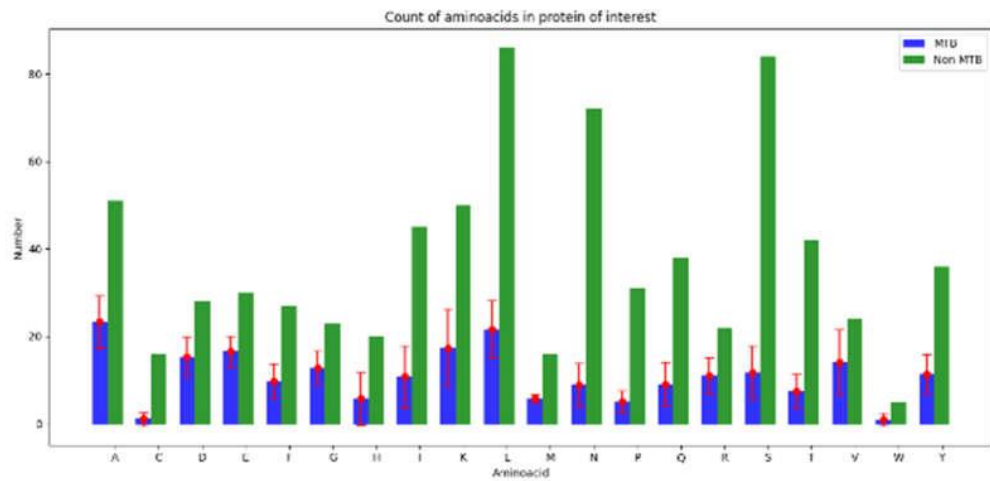


Рисунок 2.5 – Порівняння фізико-хімічних властивостей білку matA магнітосомного геномного кластера магнітотаксисних бактерій та його гомологу білків магнітосомного геномного кластера у протеомі у дріжджів *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745

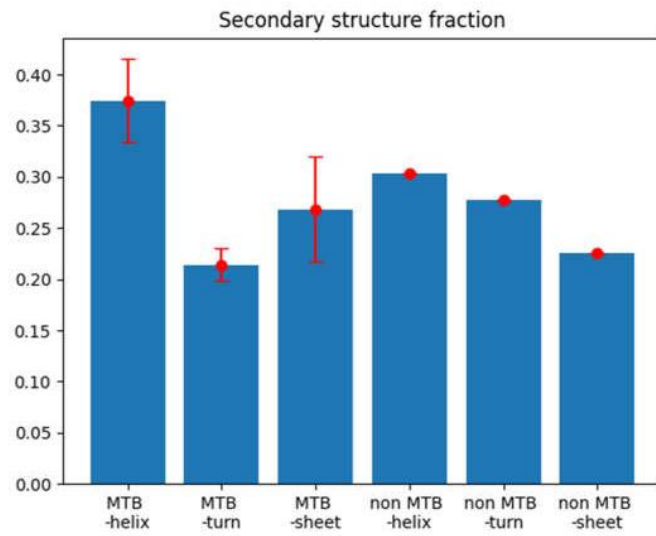
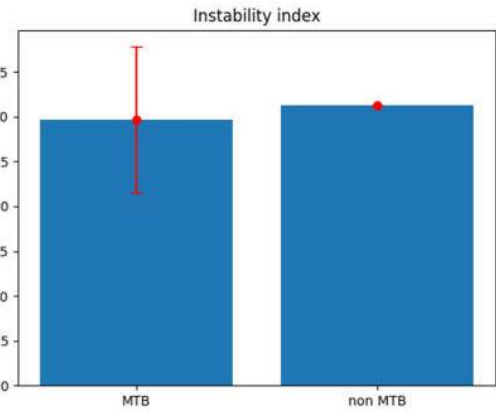
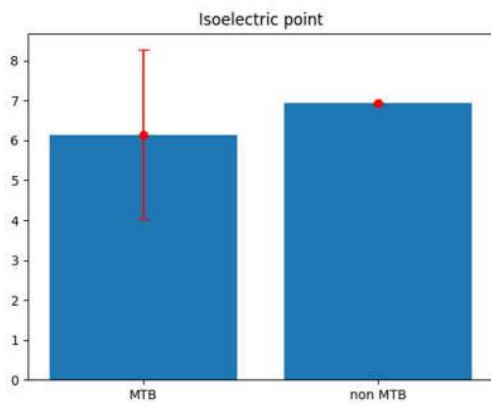
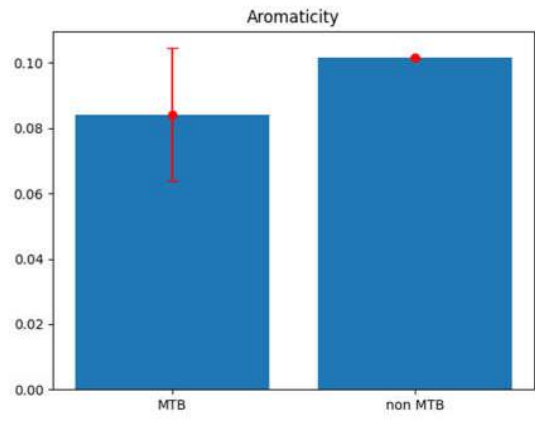
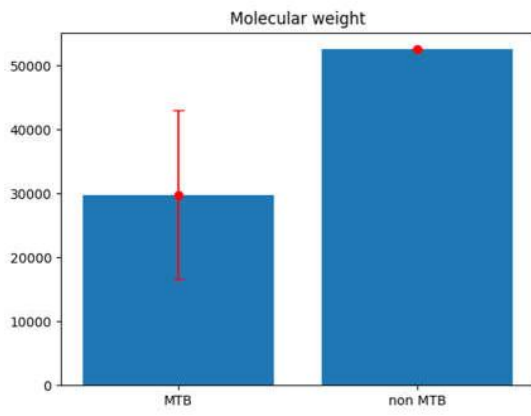
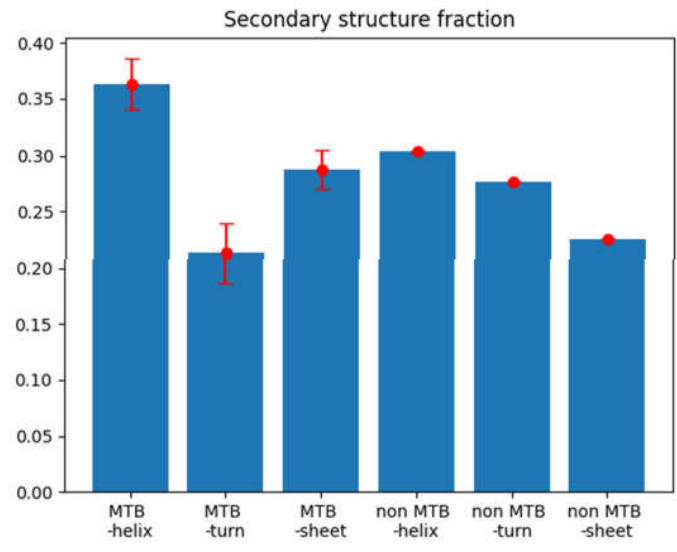
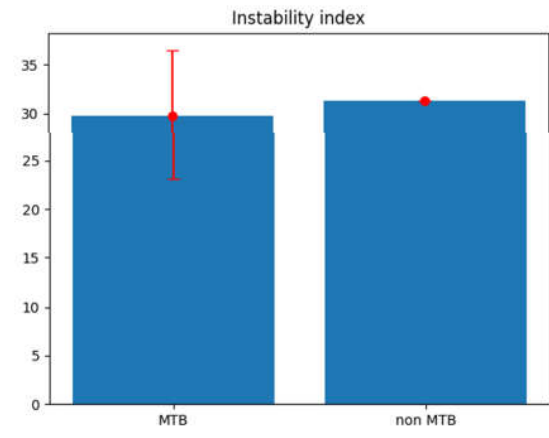
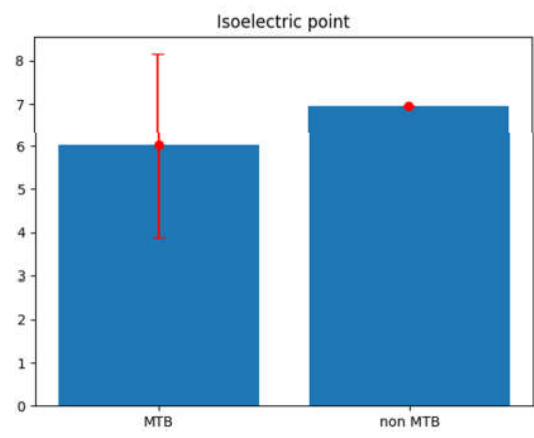
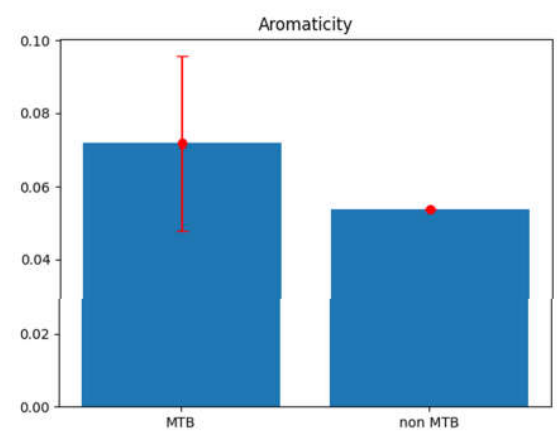
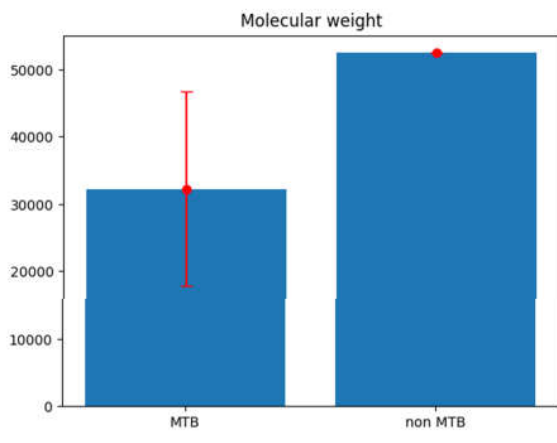




Рисунок 2.6 – Порівняння фізико-хімічних властивостей білку matB магнітосомного геномного кластера магнітотаксисних бактерій та його гомологу білків магнітосомного геномного кластера у протеомі у дріжджів *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745





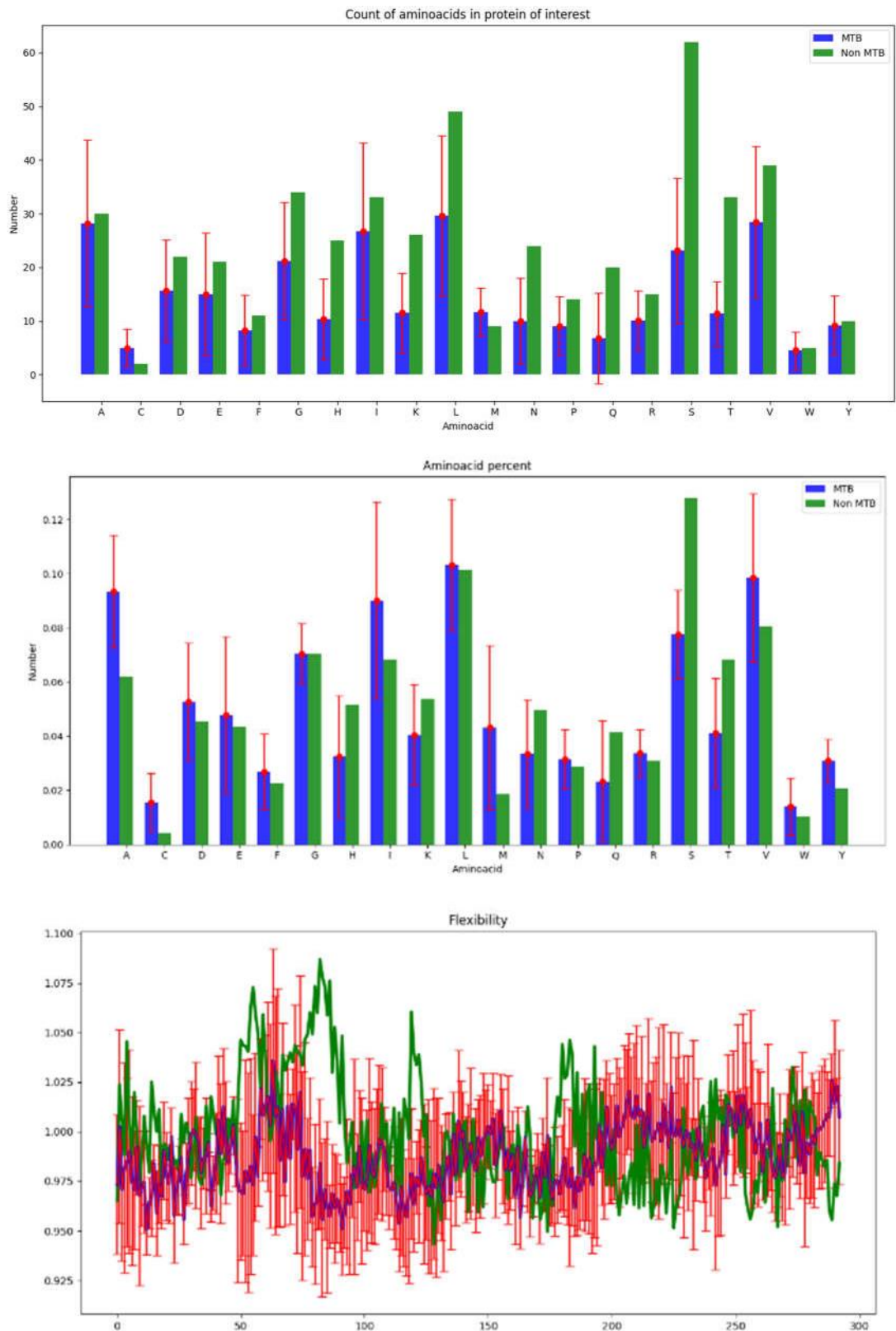
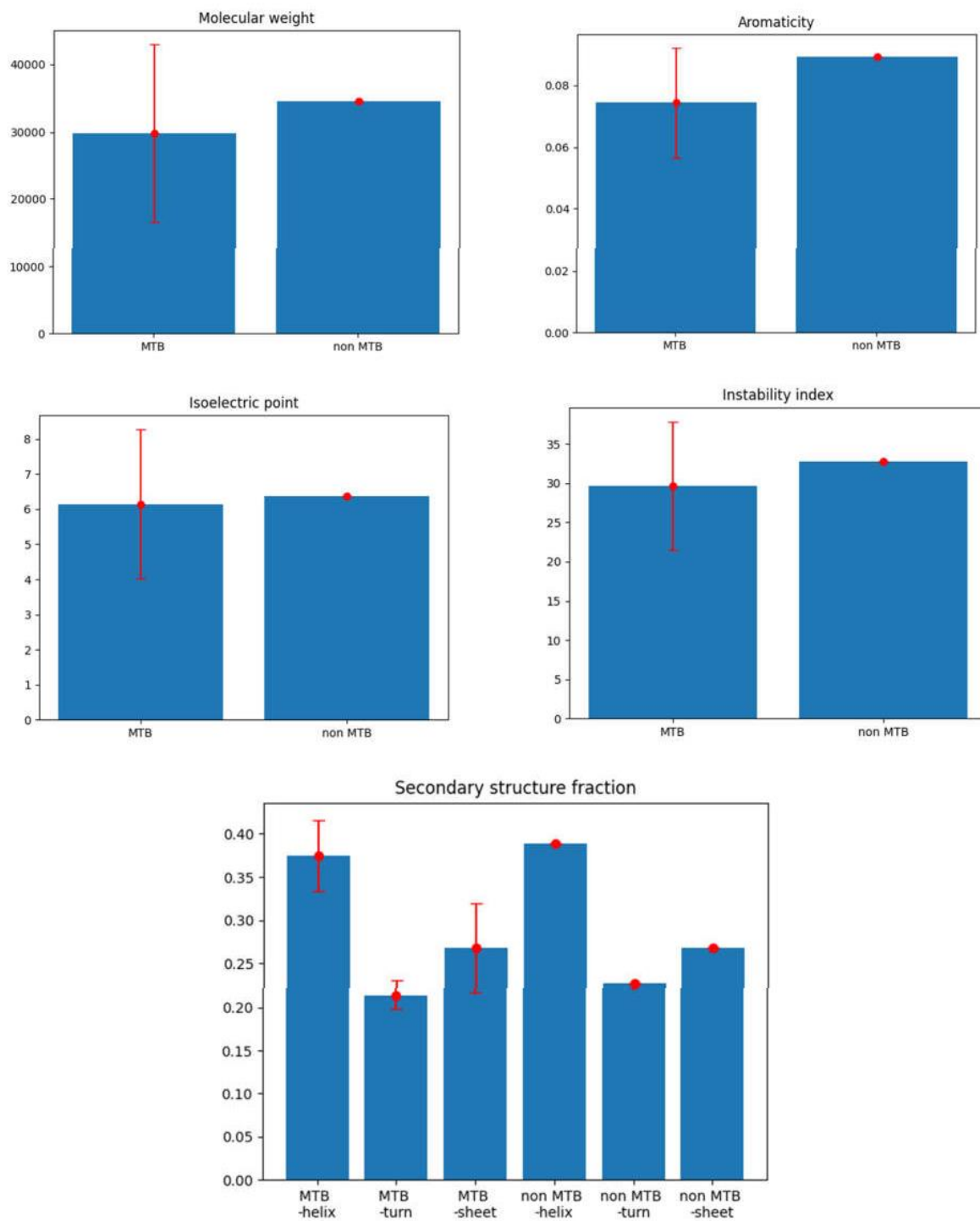


Рисунок 2.7 – Порівняння фізико-хімічних властивостей білку matM магнітосомного геномного кластера магнітотаксисних бактерій та його гомологу білків магнітосомного геномного кластера у протеомі у дріжджів *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745



Гомологи білків магнітосомного геномного кластера *Lactobacillus plantarum*

JDM1 (рис. 2.8-2.12):



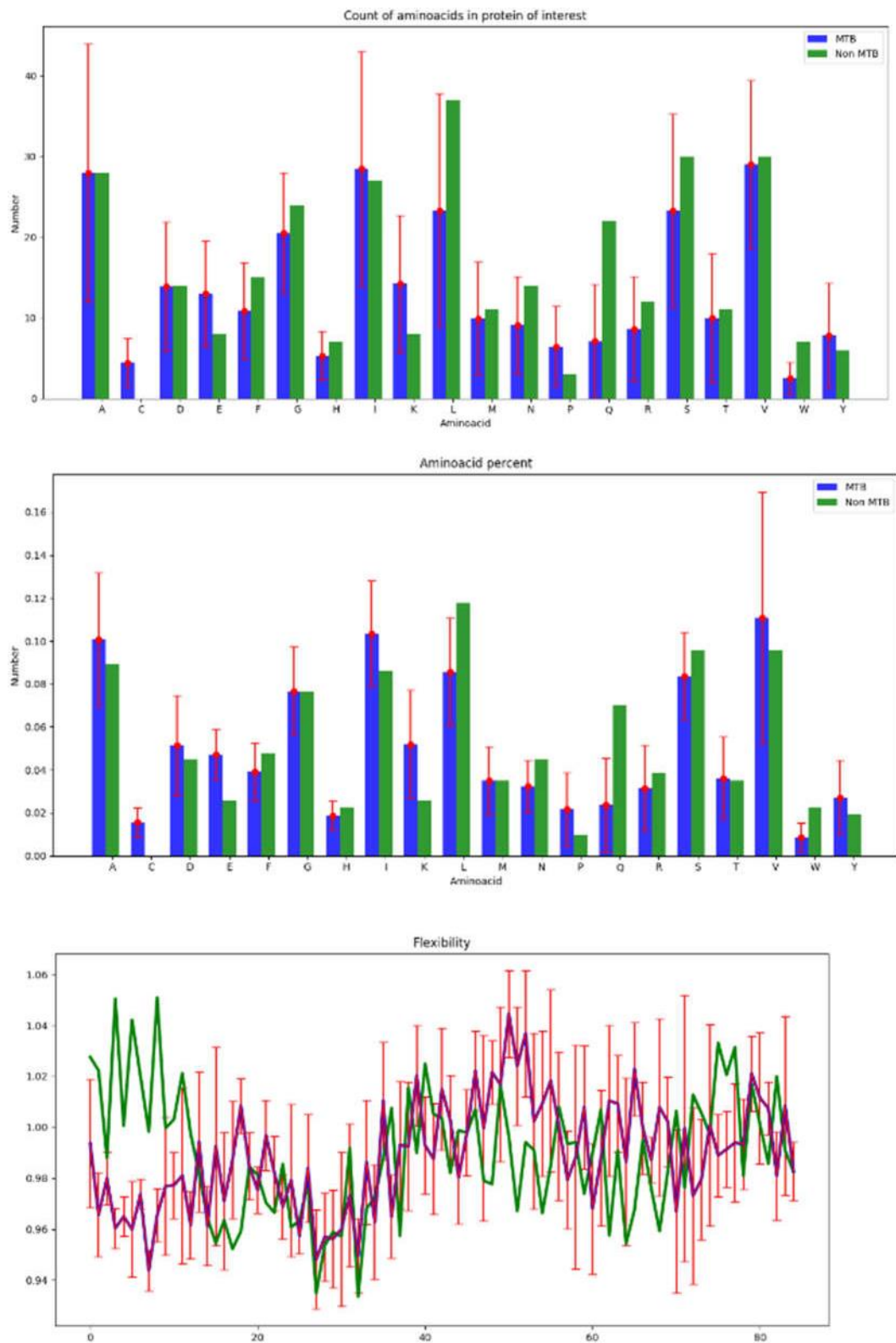
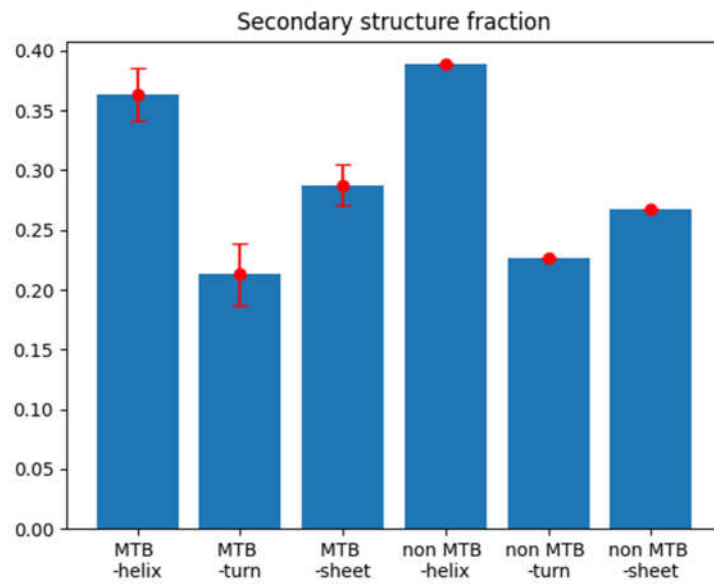
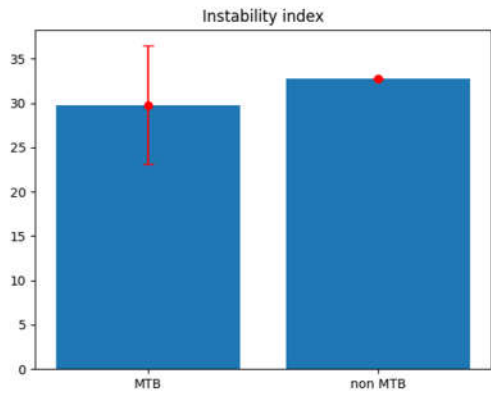
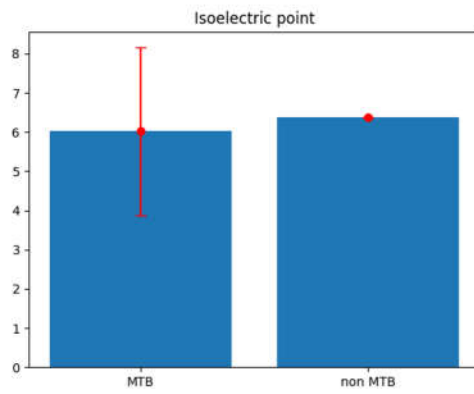
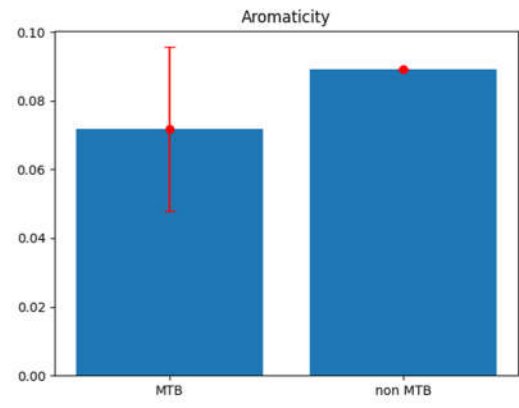
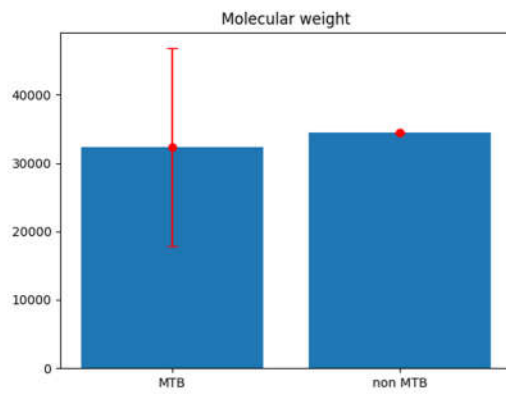


Рисунок 2.8 – Порівняння фізико-хімічних властивостей білку matB магнітосомного геномного кластера магнітотаксисних бактерій та його гомологу білків магнітосомного геномного кластера у протеомі бактерії *Lactobacillus plantarum* JDM1



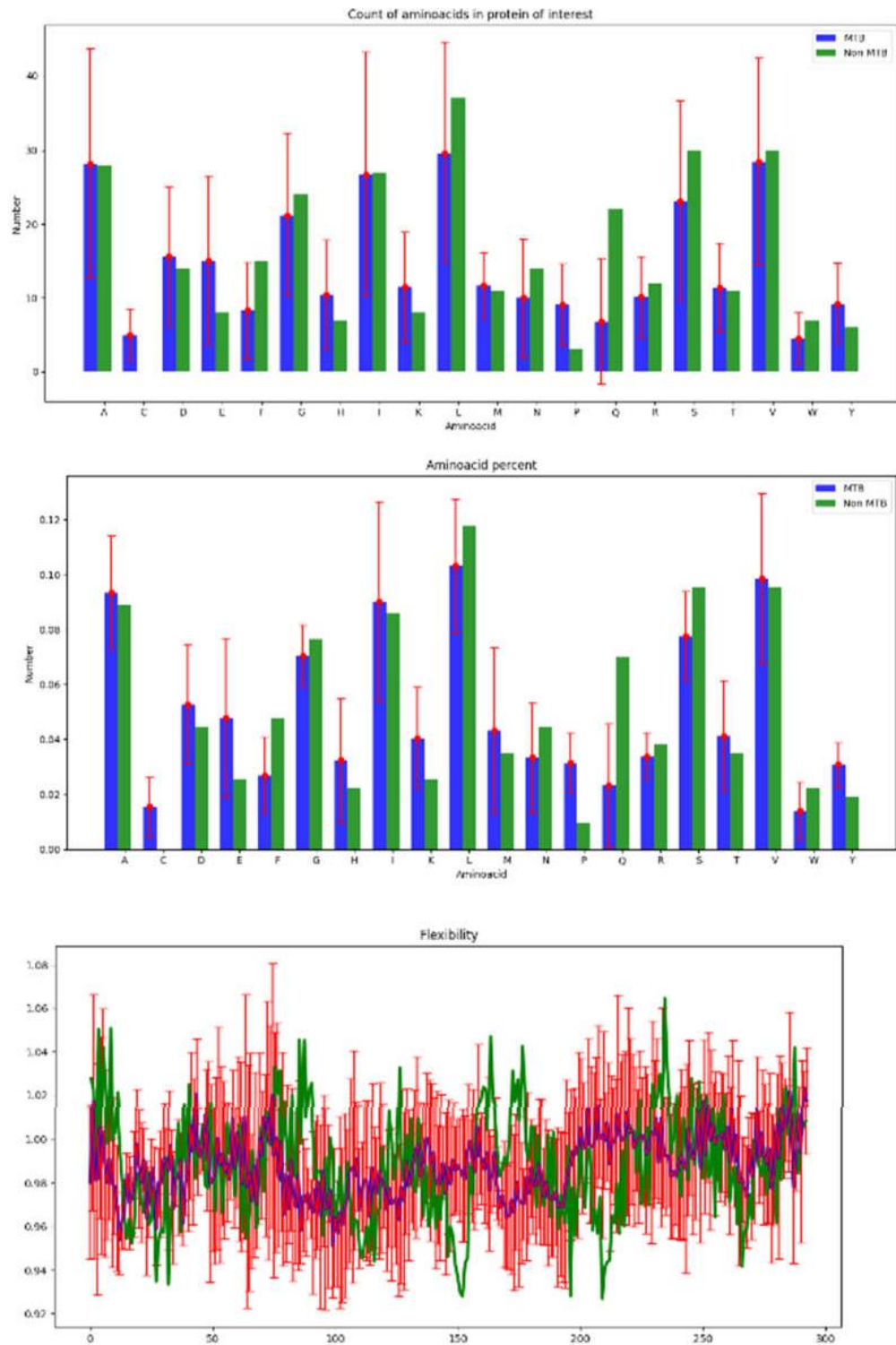
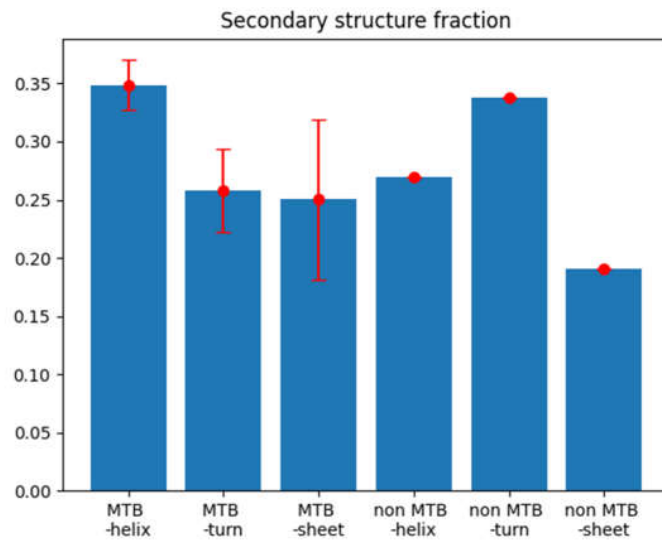
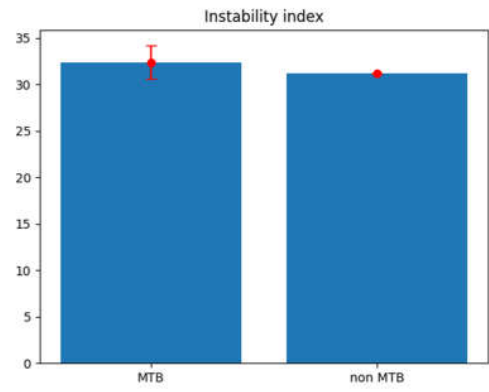
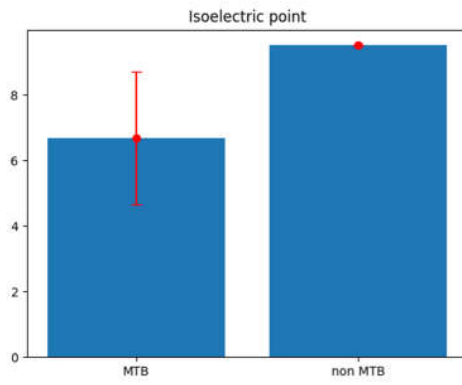
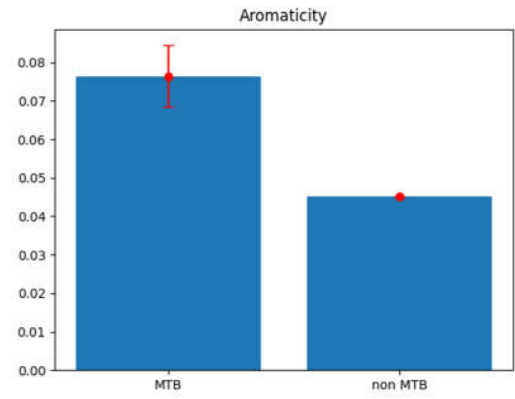
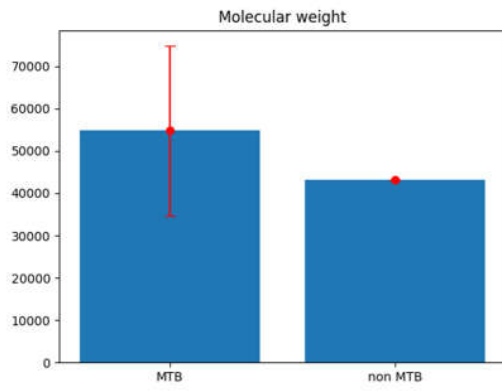


Рисунок 2.9 – Порівняння фізико-хімічних властивостей білку tamM магнітосомного геномного кластера магнітотаксисних бактерій та його гомологу білків магнітосомного геномного кластера у протеомі бактерії *Lactobacillus plantarum* JDM1



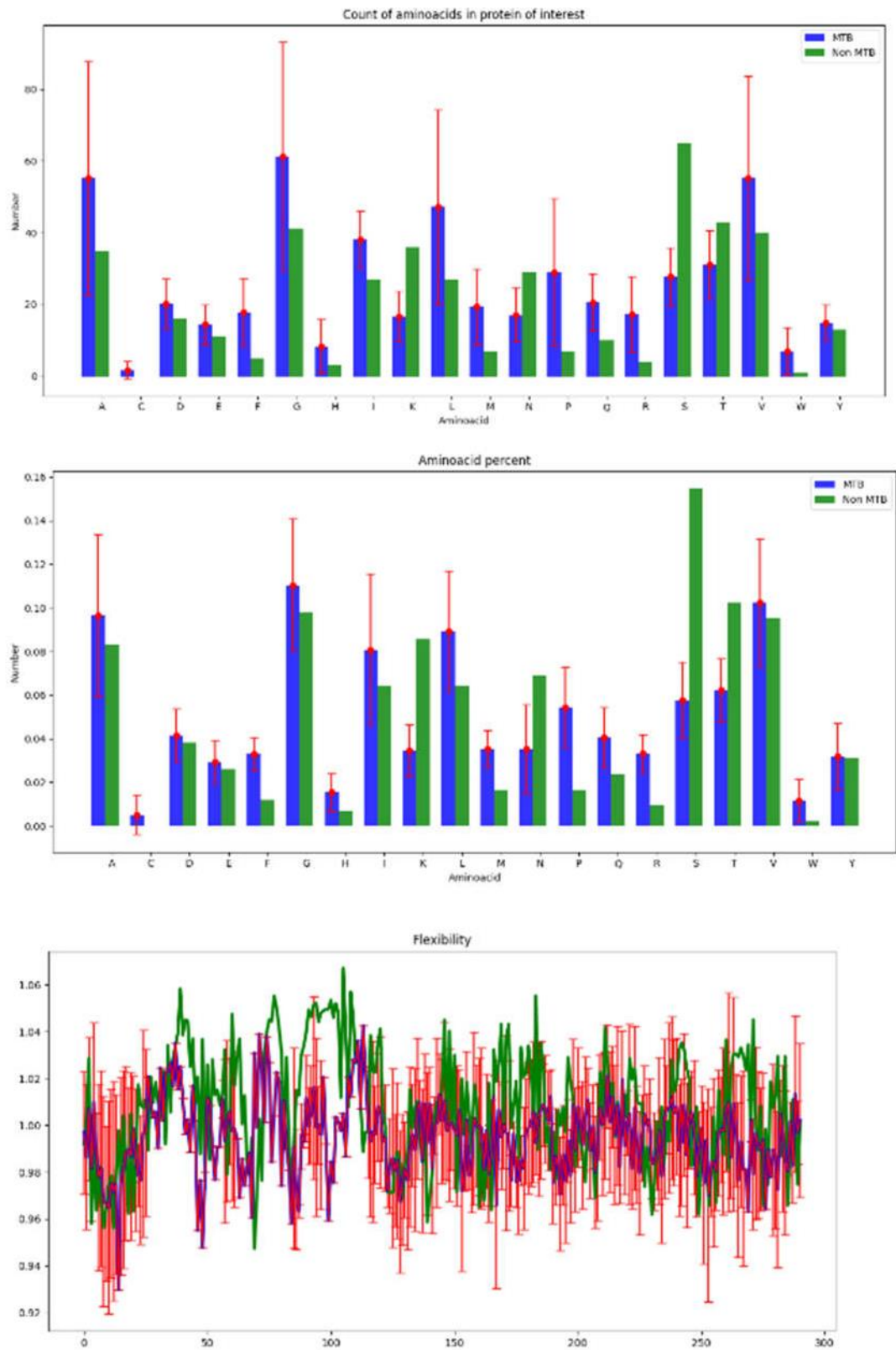
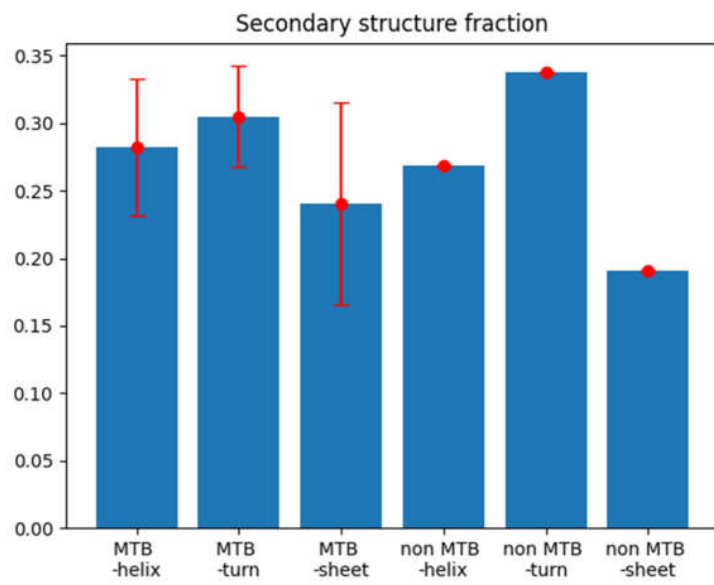
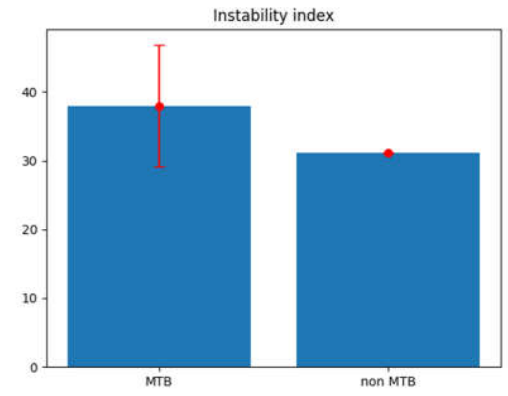
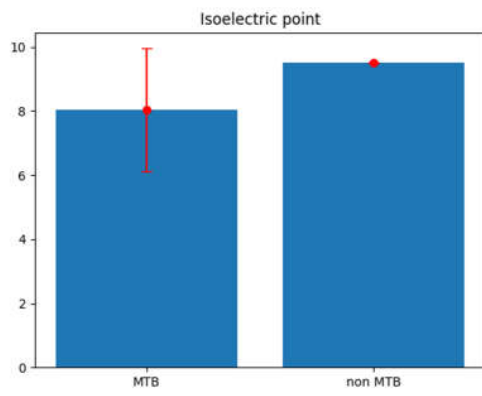
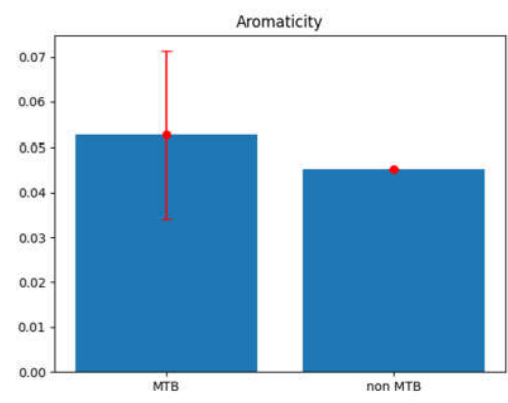
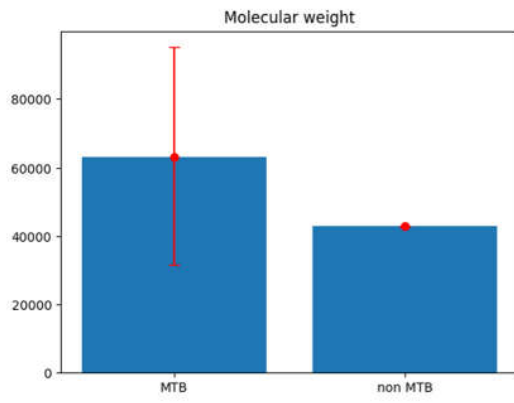


Рисунок 2.10 – Порівняння фізико-хімічних властивостей білку matO магнітосомного геномного кластера магнітотаксисних бактерій та його гомологу білків магнітосомного геномного кластера у протеомі бактерії *Lactobacillus plantarum* JDM1



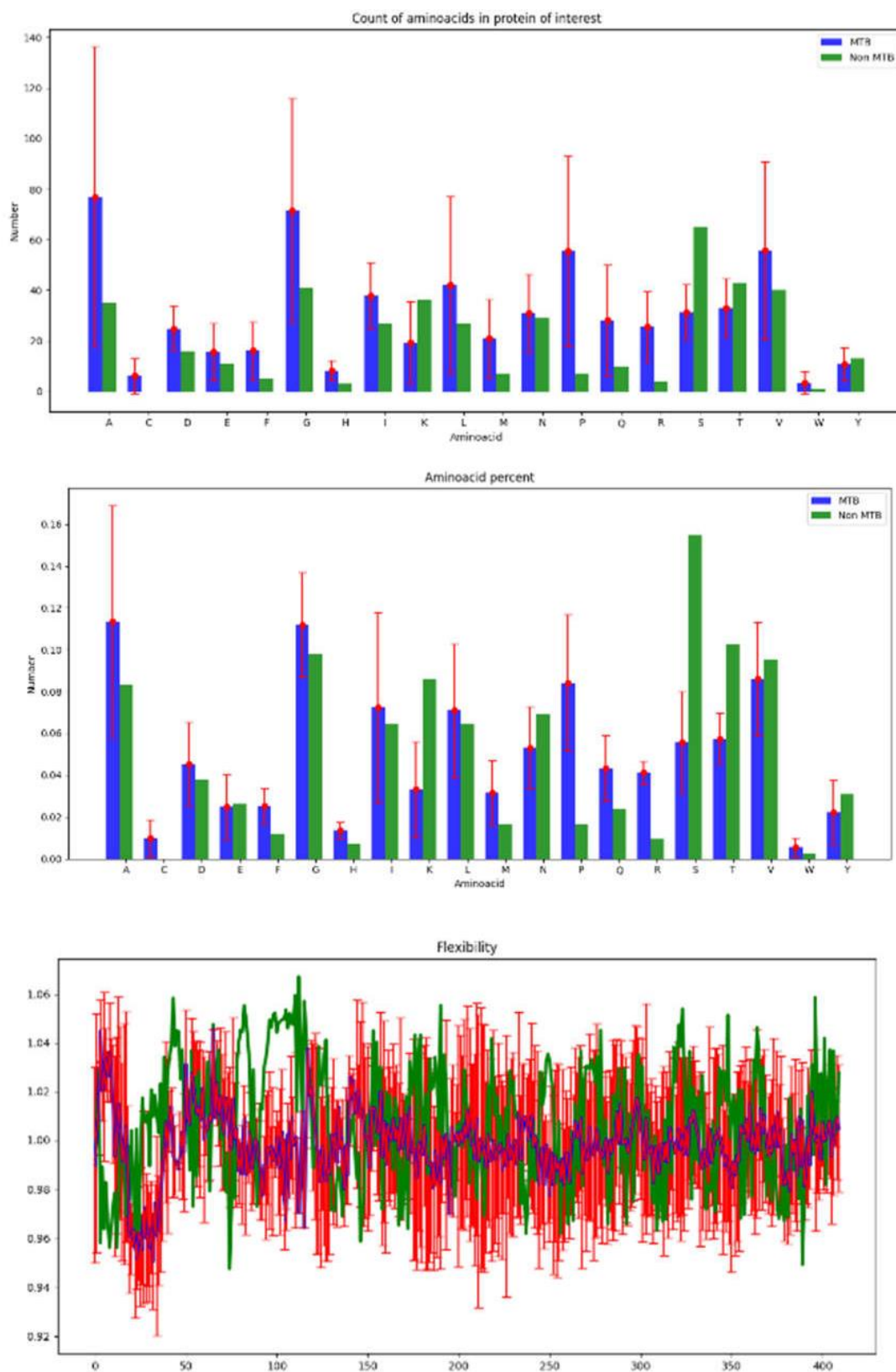
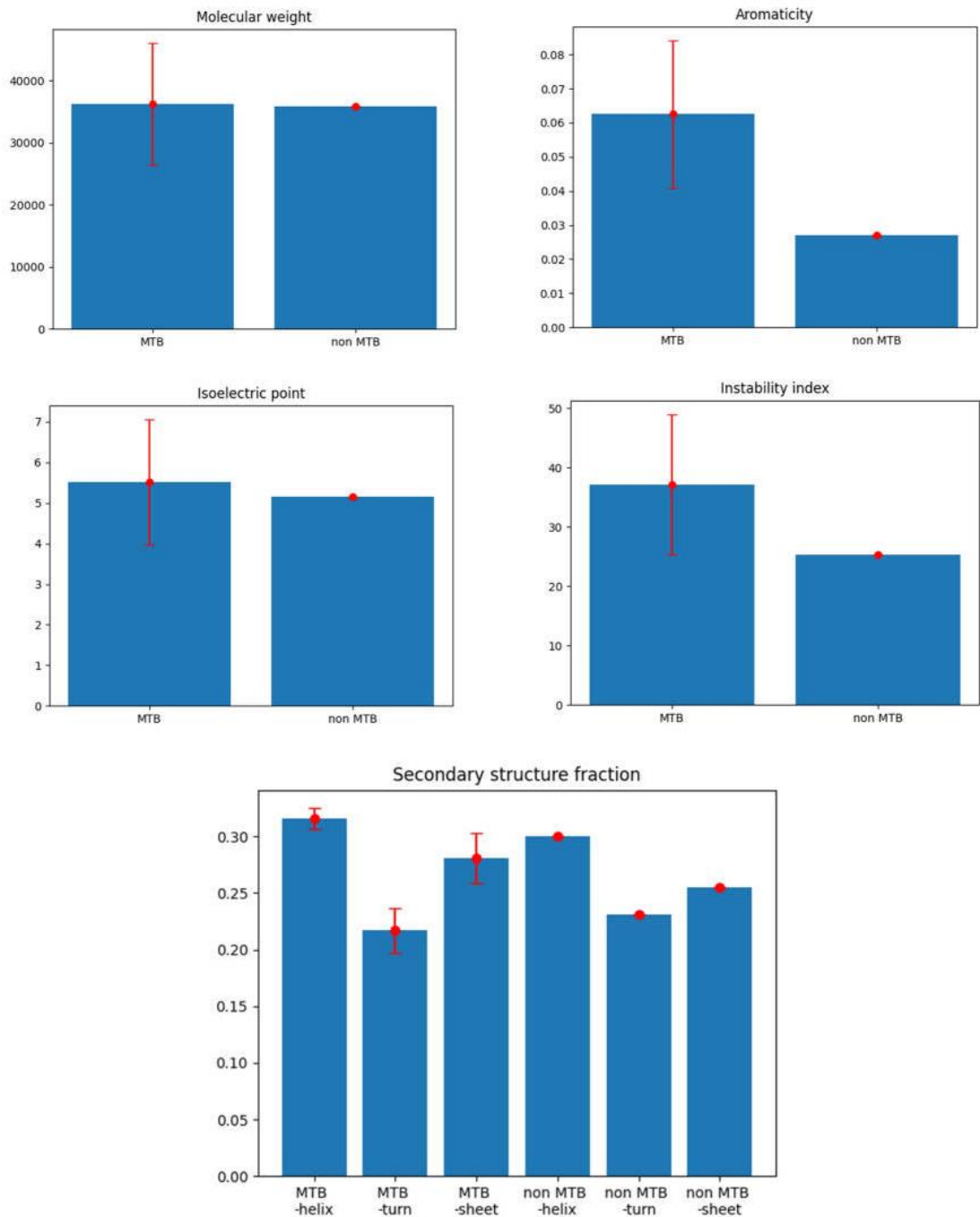


Рисунок 2.11 – Порівняння фізико-хімічних властивостей білку matE магнітосомного геномного кластера магнітотаксисних бактерій та його гомологу



білків магнітосомного геномного кластера у протеомі бактерії *Lactobacillus plantarum* JDM1



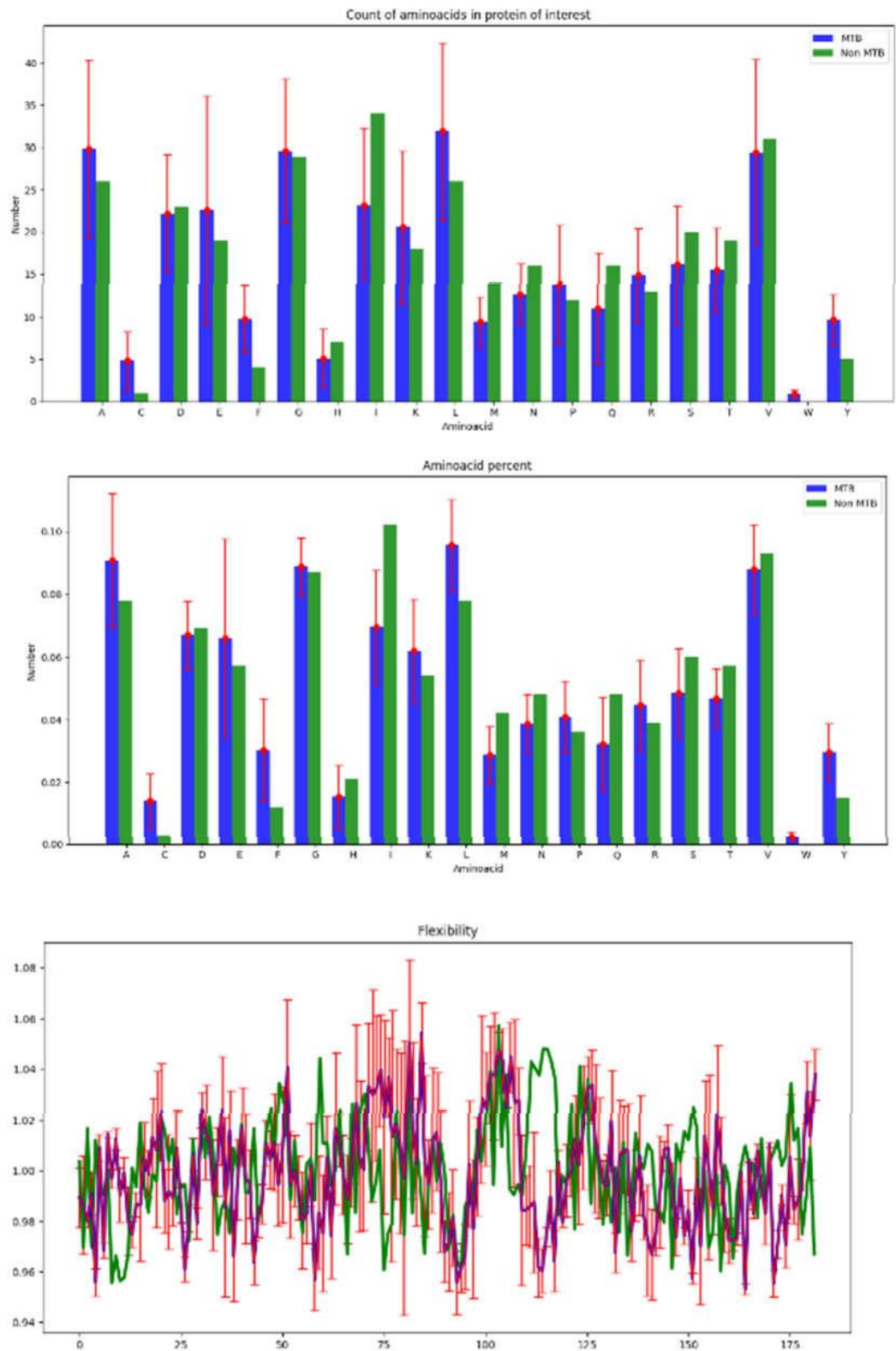
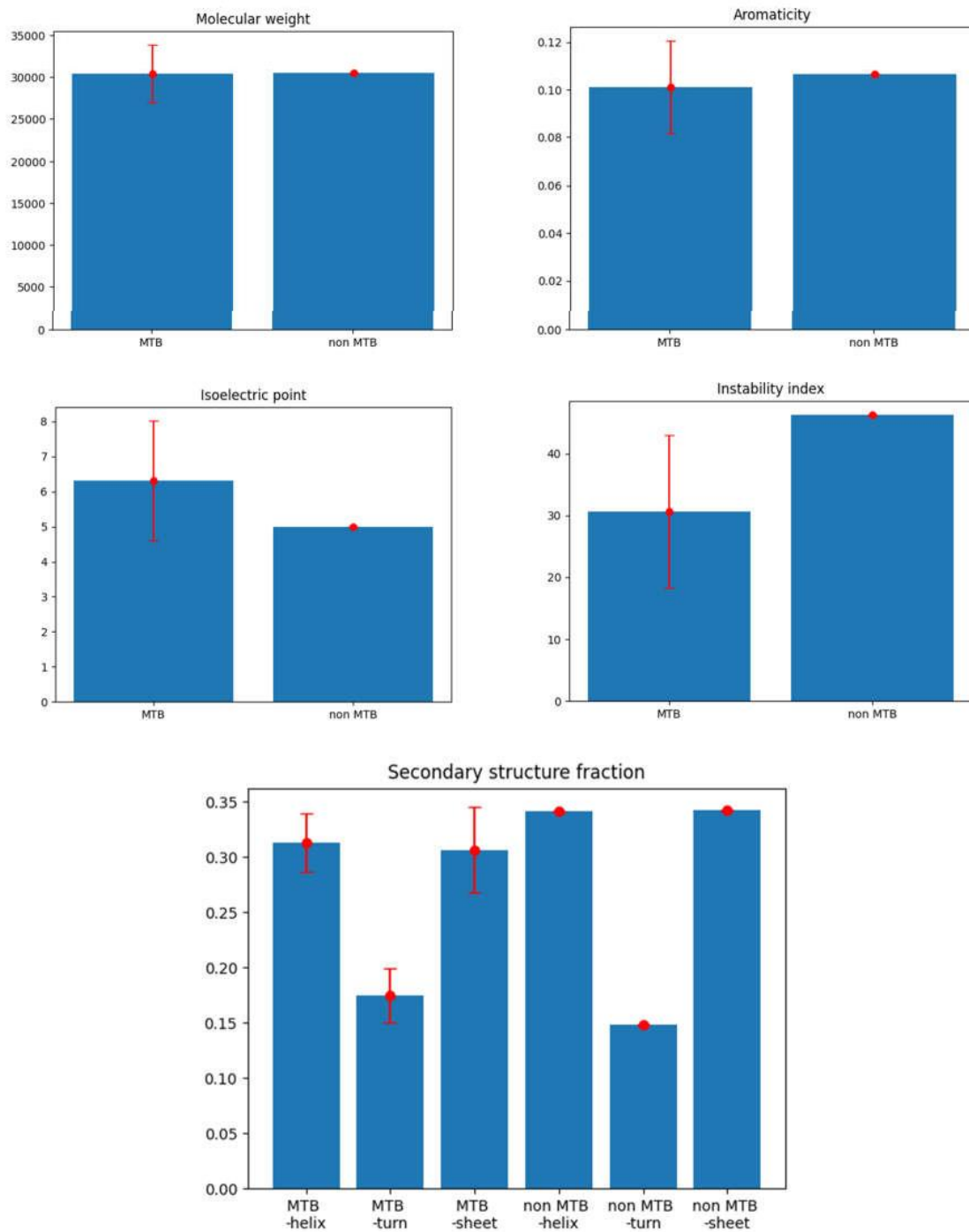


Рисунок 2.12 – Порівняння фізико-хімічних властивостей білку matK магнітосомного геномного кластера магнітотаксисних бактерій та його гомологу білків магнітосомного геномного кластера у протеомі бактерії *Lactobacillus plantarum* JDM1

Гомологи білків магнітосомного геномного кластера у *Bacillus subtilis* 168

(рис. 2.13-2.18):



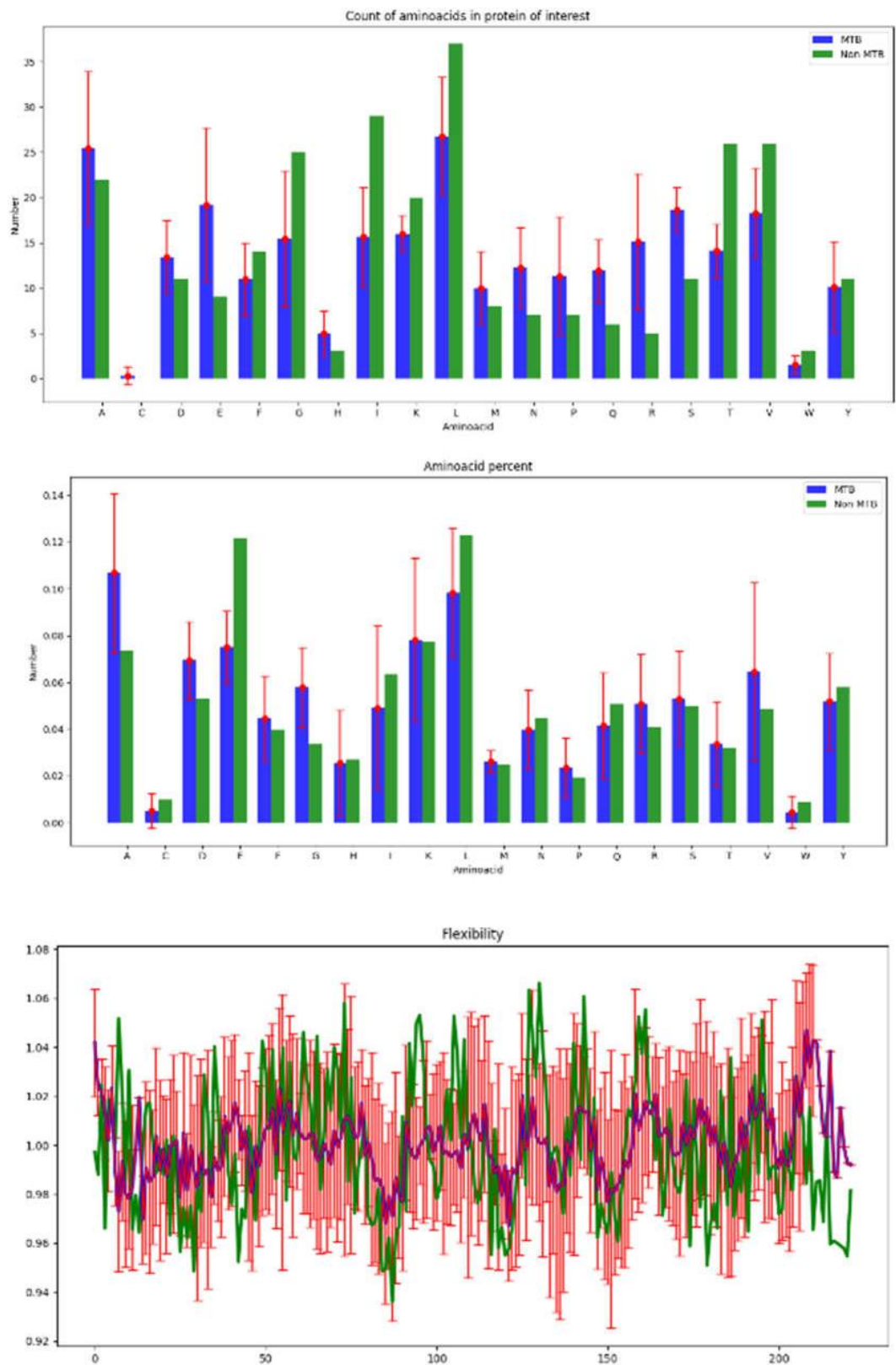
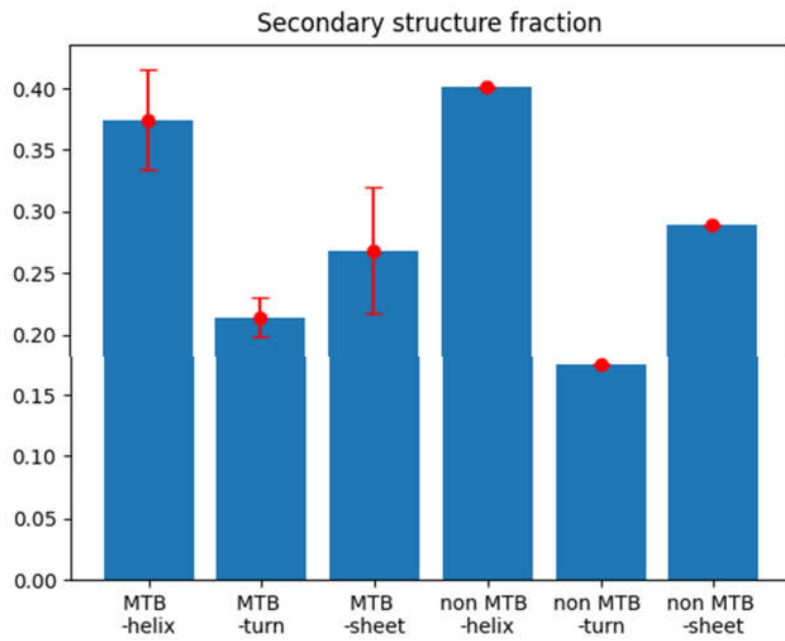
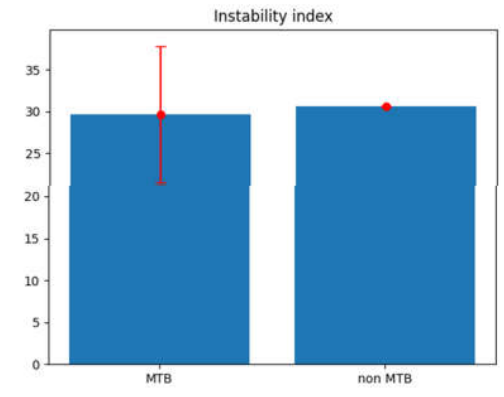
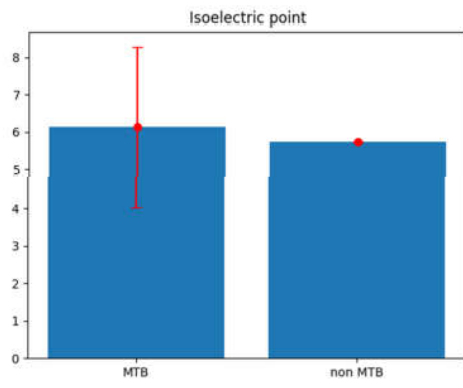
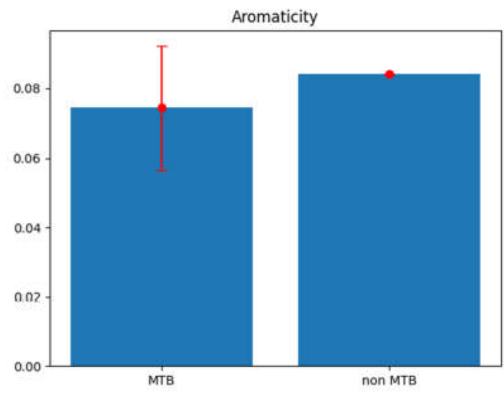
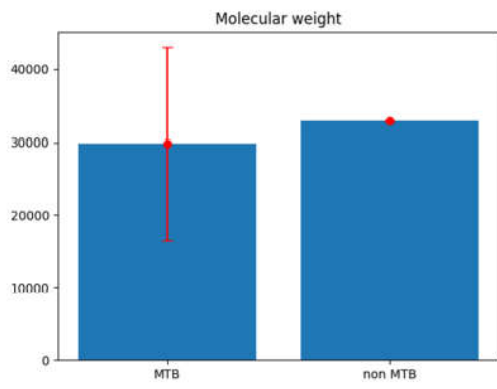


Рисунок 2.13 – Порівняння фізико-хімічних властивостей білку matA магнітосомного геномного кластера магнітотаксисних бактерій та його гомологу білків магнітосомного геномного кластера у протеомі бактерії *Bacillus subtilis* 168



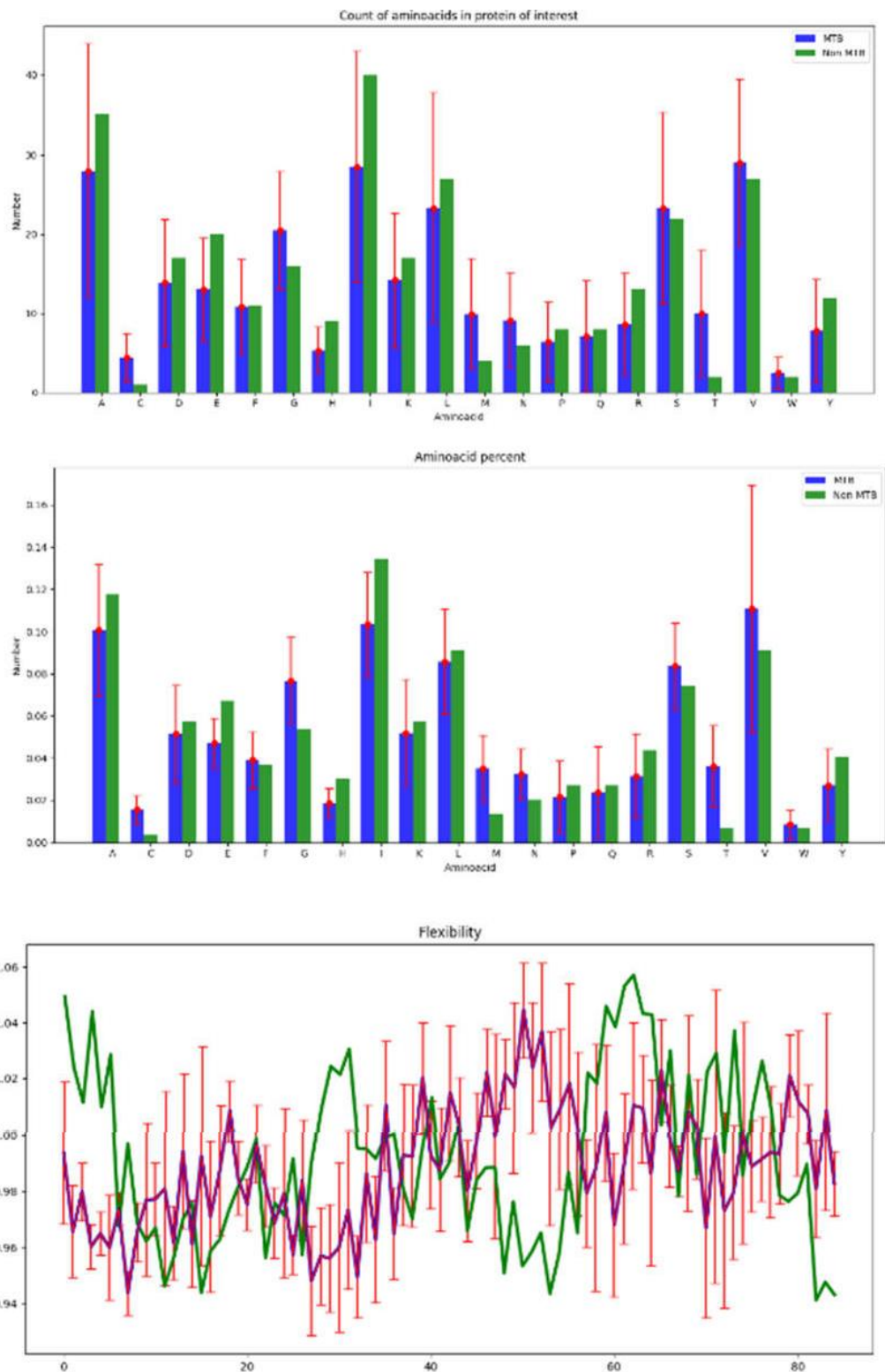
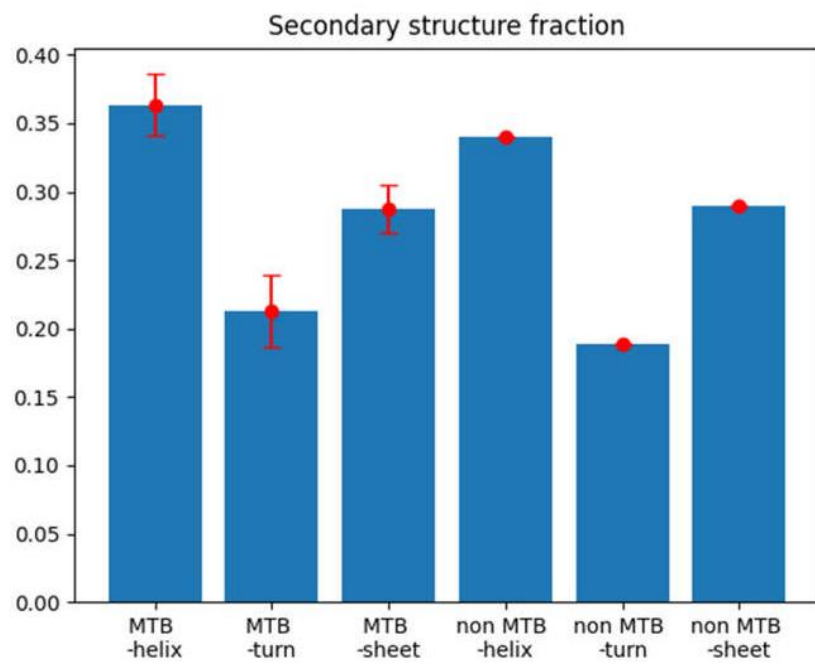
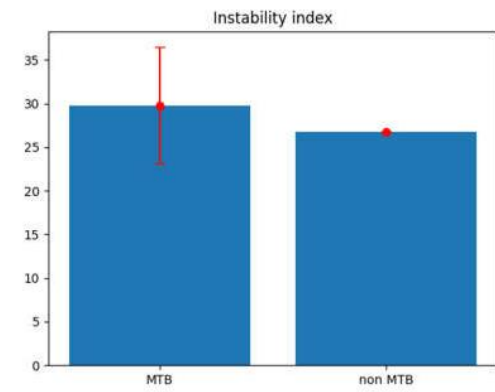
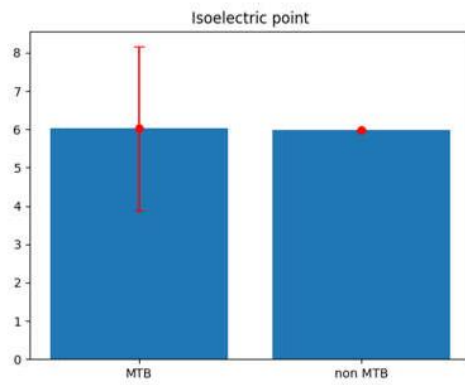
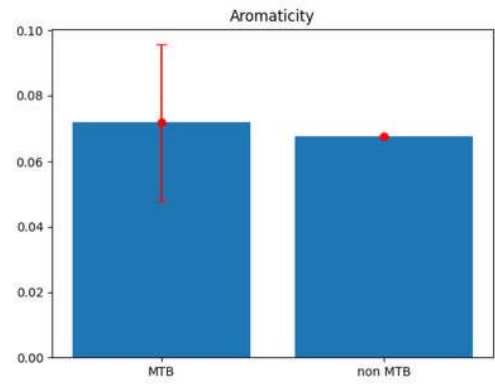
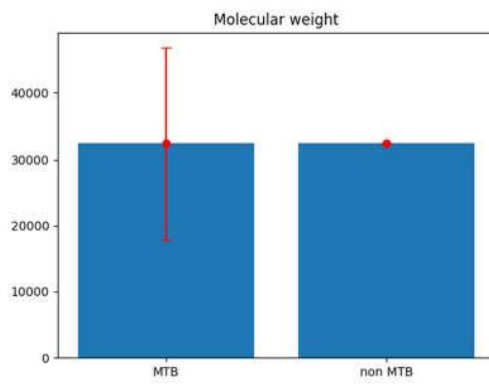


Рисунок 2.14 – Порівняння фізико-хімічних властивостей білку tamB магнітосомного геномного кластера магнітотаксисних бактерій та його гомологу білків магнітосомного геномного кластера у протеомі бактерії *Bacillus subtilis* 168





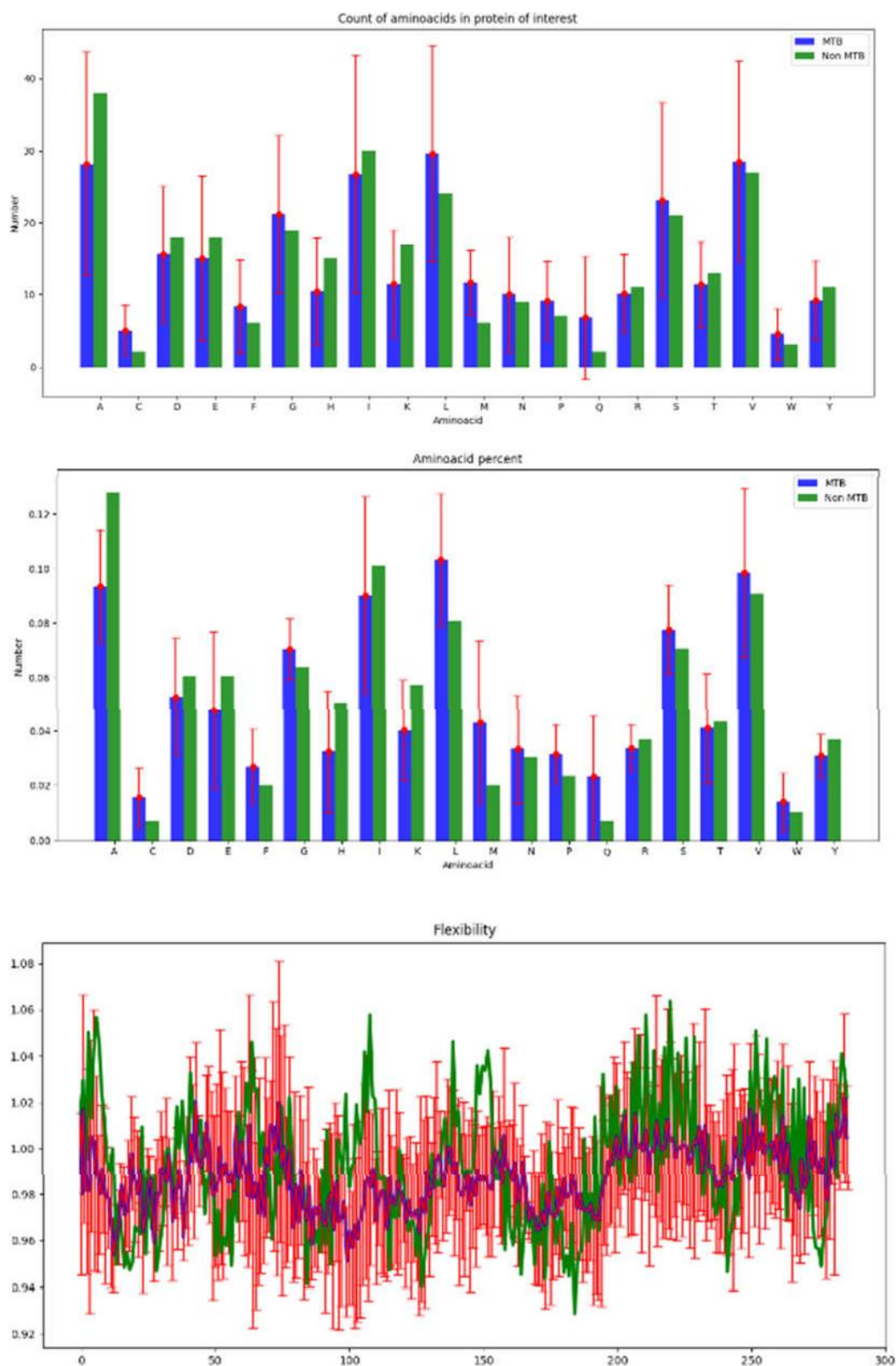
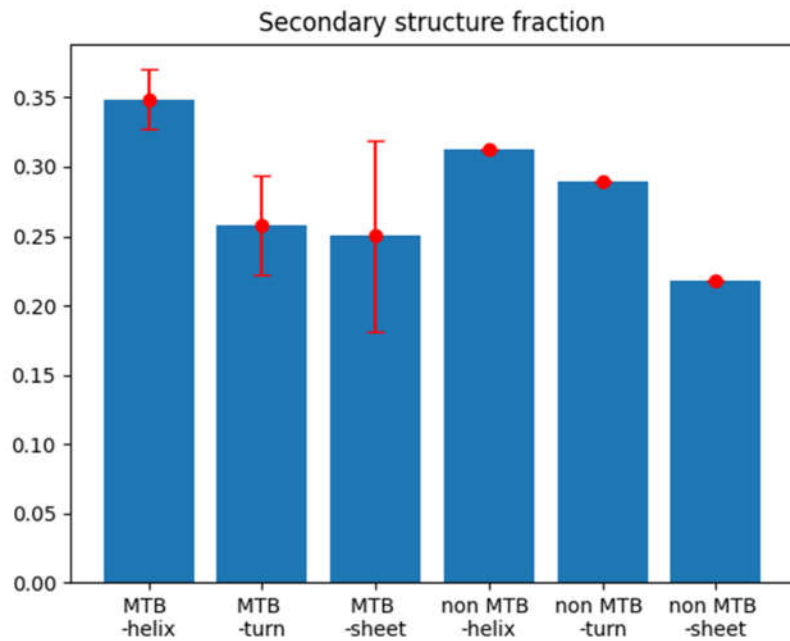
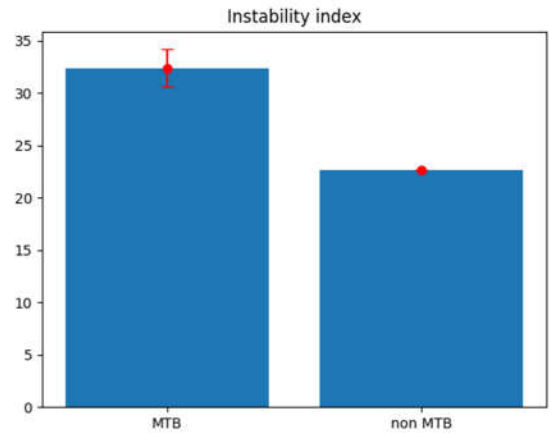
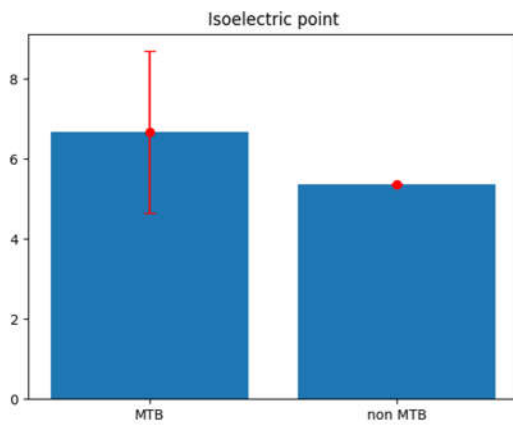
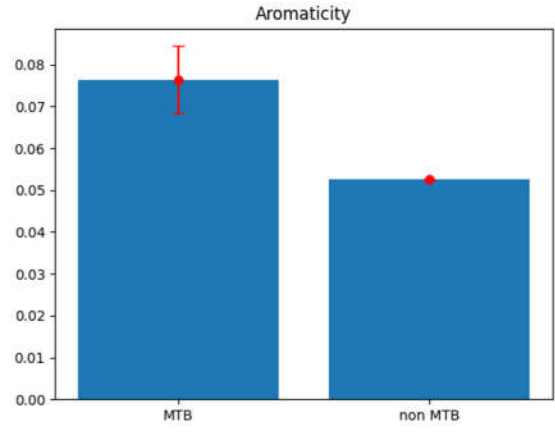
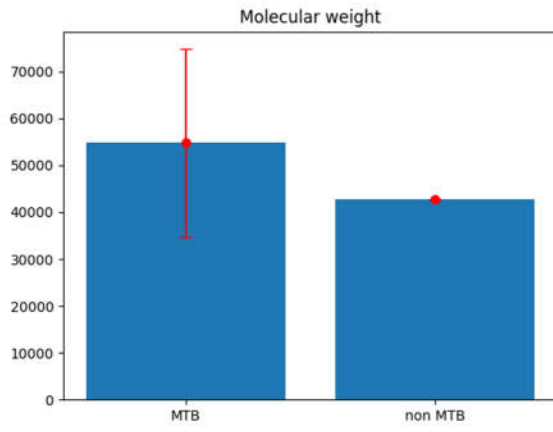


Рисунок 2.15 – Порівняння фізико-хімічних властивостей білку matM магнітосомного геномного кластера магнітотаксисних бактерій та його гомологу білків магнітосомного геномного кластера у протеомі бактерії *Bacillus subtilis* 168





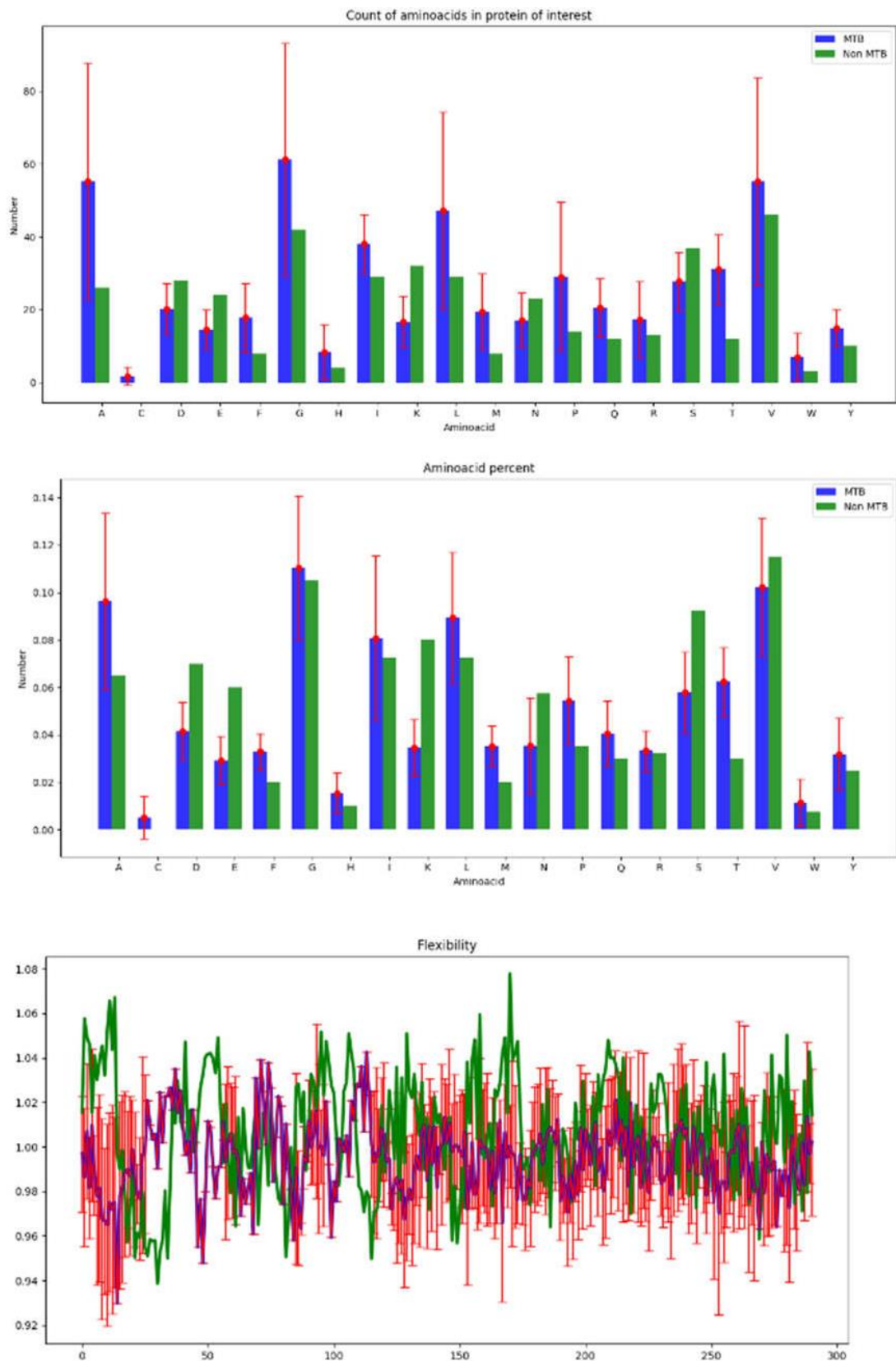


Рисунок 2.16 – Порівняння фізико-хімічних властивостей білку matO магнітосомного геномного кластера магнітотаксисних бактерій та його гомологу білків магнітосомного геномного кластера у протеомі бактерії *Bacillus subtilis* 168

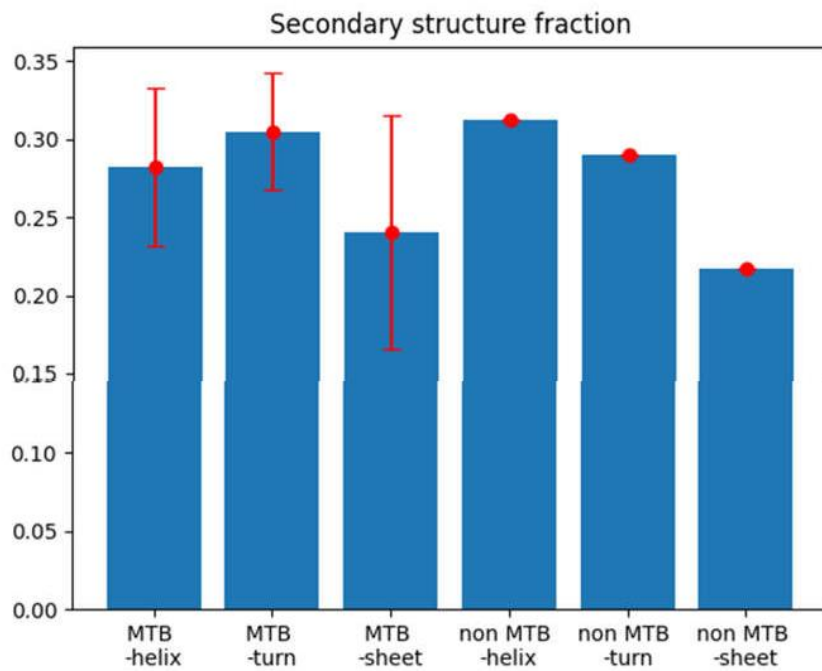
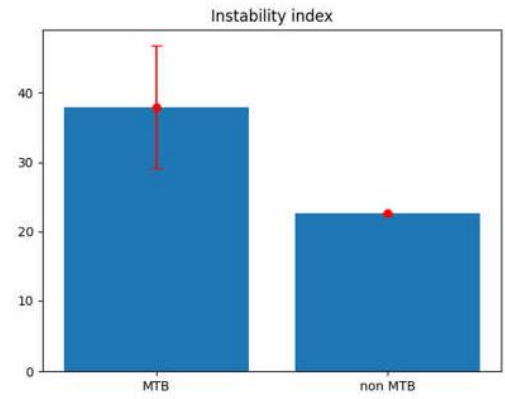
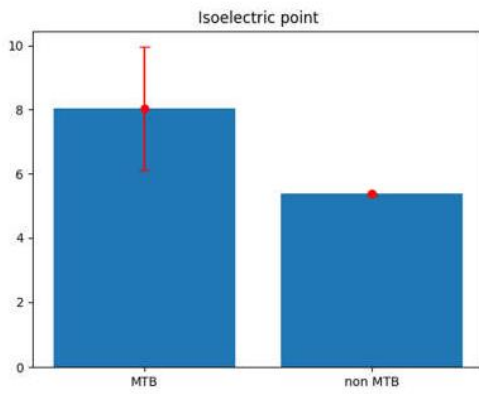
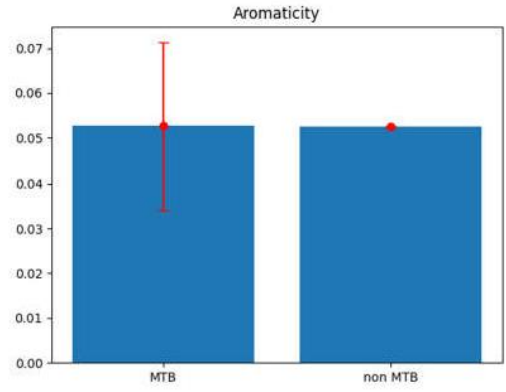
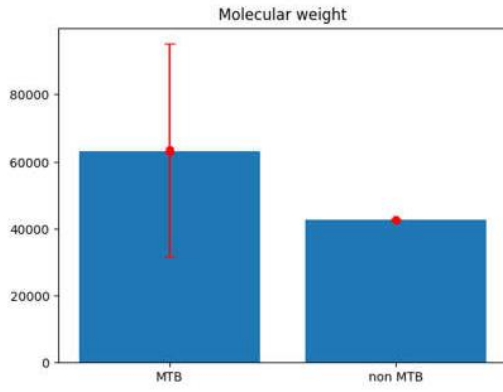
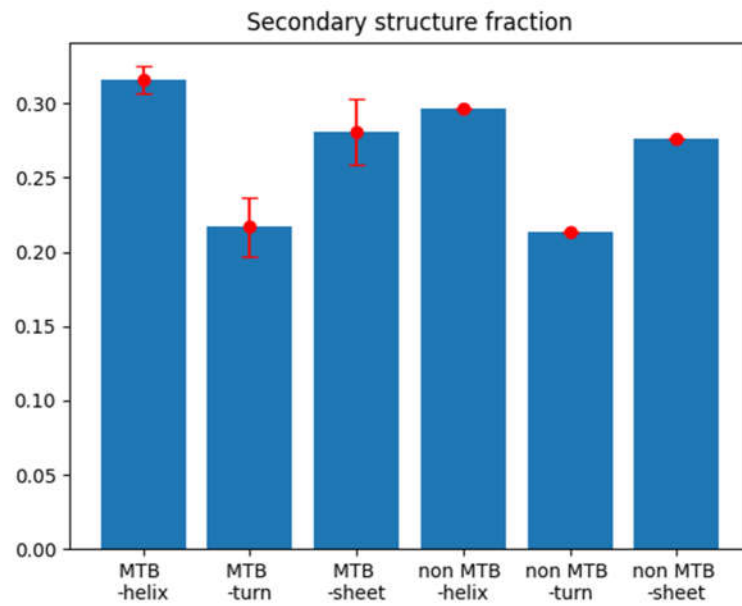
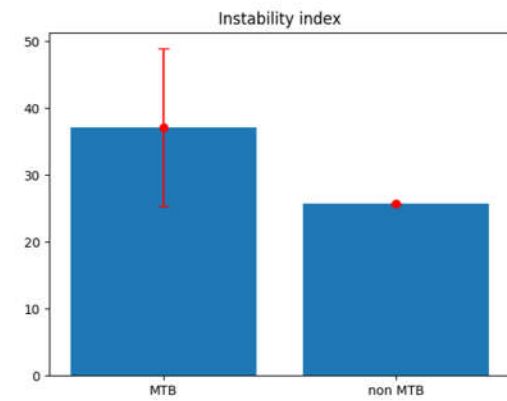
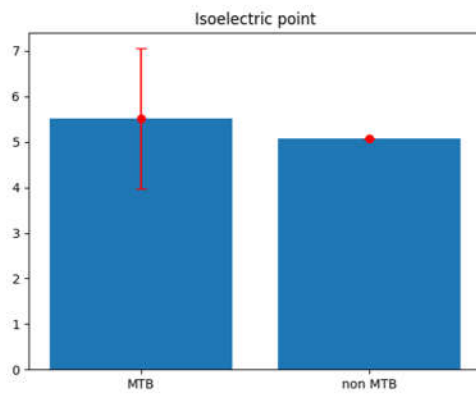
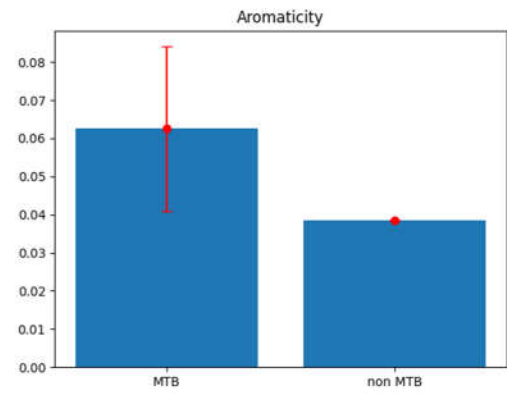
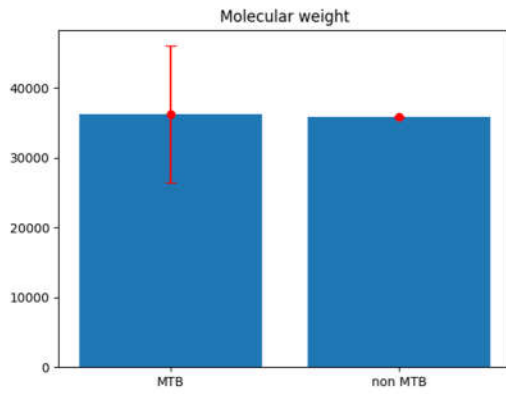




Рисунок 2.17 – Порівняння фізико-хімічних властивостей білку matE магнітосомного геномного кластера магнітотаксисних бактерій та його гомологу білків магнітосомного геномного кластера у протеомі бактерії *Bacillus subtilis* 168



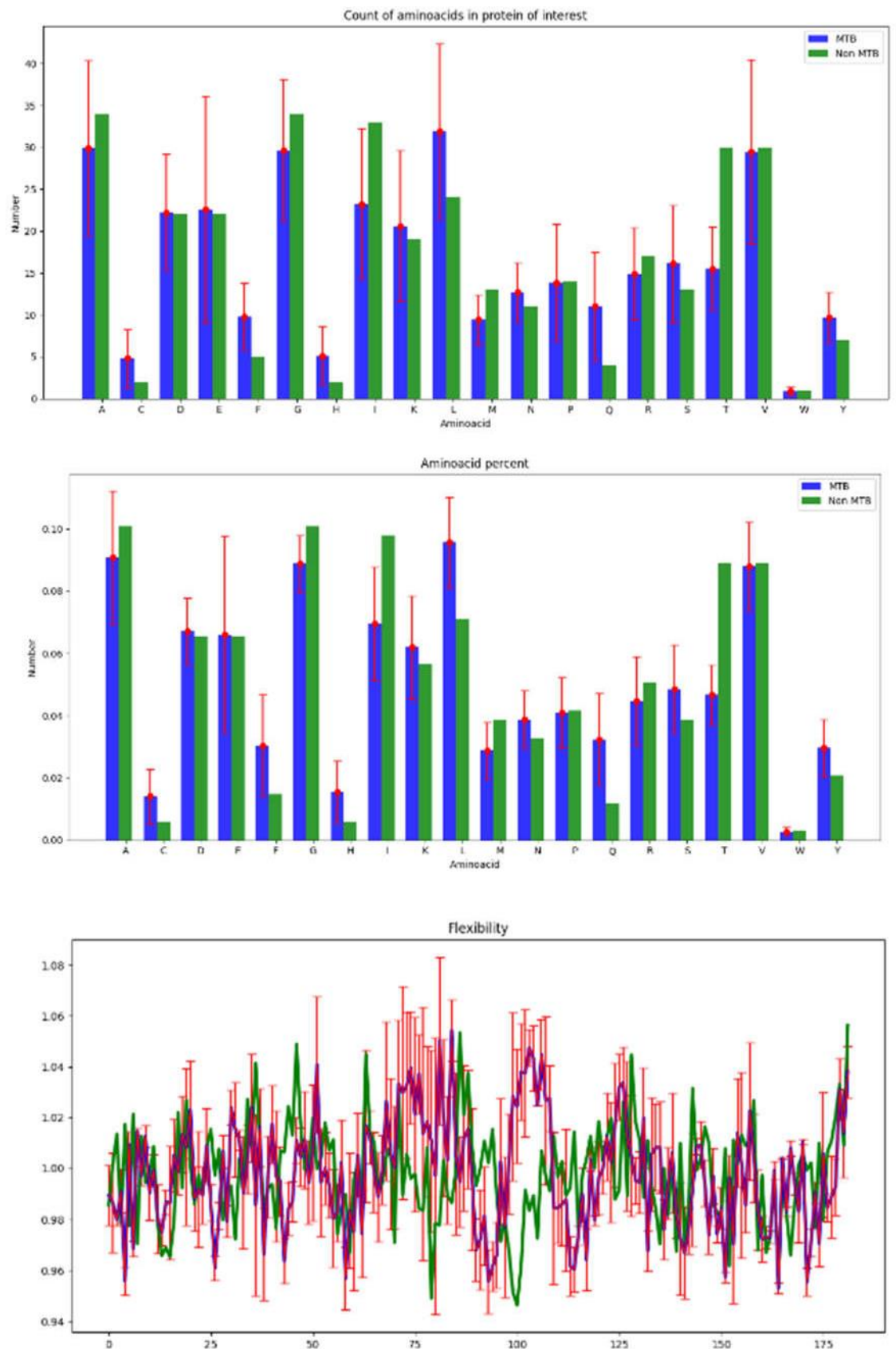


Рисунок 2.18 – Порівняння фізико-хімічних властивостей білку matK магнітосомного геномного кластера магнітотаксисних бактерій та його гомологу білків магнітосомного геномного кластера у протеомі бактерії *Bacillus subtilis* 168

Після аналізу шести основних білків біомінералізації у чотирьох пробіотиків маємо наступні результати. Для *Aspergillus niger* CBS 513.88 збільшення молекулярної ваги гомологів білків в порівнянні з білками МО МТБ MamA, MamO, MamE. Ізоелектрична точка і ароматичність гомологів знаходиться у діапазоні значень МТБ. Індекс стабільності відрізняється для гомологів MamA і MamO. Параметри вторинної структури збереглися для гомолога MamE, інші зазнали змін. Кількість і вміст амінокислотних залишків (АКЗ) суттєво відрізняється, так як молекулярна вага не вписується у діапазон МТБ. Саме тому і параметри гнучкості відрізняються від тих що мають білки МО МТБ.

*Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 теж характерна невідповідність параметрам молекулярної ваги, звідси також різниця у кількості та вмісті АКЗ. Ароматичність зберіглась у гомологів MamA, MamM, MamE. У гомолога MamA єдиного не збереглися ізоелектрична точка та індекс стабільності. Параметри вторинної структури збереглися лише для гомологів MamO і MamK.

*Lactobacillus plantarum* JDM1 молекулярна вага збереглась у всіх гомологів крім MamA. У гомологів MamO і MamK не зберіглась ароматичність. Індекс стабільності зберігся у всіх гомологів. Ізоелектрична точка не зберіглась у гомологів MamA і MamO. Вторинна структура збережена у гомологів MamB, MamO, MamE. Як видно з діаграм кількість і вміст АКЗ відрізняється від білків гомологів МТБ, так само і гнучкість.

*Bacillus subtilis* 168 молекулярна вага (виключення гомолог MamA) і ароматичність мають ідентичні результати з *Lactobacillus plantarum* JDM1, це не дивно обидва мікроорганізми належать до внутрішньоклітинних БМН. Ізоелектрична точка відрізняється у гомолога MamE. У гомологів MamA, MamO, MamE не зберігся індекс стабільності. Параметри вторинної структури зберіглись у гомологів MamA, MamM, MamE. Хоч молекулярна вага знаходиться у діапазоні білків МТБ, вміст і кількість АКЗ відрізняється як і гнучкість.

Послідовності АКЗ зазнають еволюційних змін, що і впливає на їх структуру і властивості, цим можна пояснити невідповідність вмісту і кількості АКЗ навіть при збереженні молекулярної маси.

Підсумовуючи результати важливим параметром є молекулярна вага білків, у зовнішньоклітинних (ЗК) вона не зберігається, а у внутрішньоклітинних (ВК) навпаки. Також для ЗК характерна ідентичність параметрів helix, turn, sheet. Гомологи MamB і MamM є найбільш стабільними за збереженням ароматичності, ізоелектричної точки, індексу стабільності. Слід відмітити, що абсолютно у всіх досліджених зразків гомологи MamB мають характерний вид графіку гнучкості. Цей білок наявний у всіх групах МТБ, можна зробити припущення, що він є найбільш давнім і зазнавав змін при еволюційних перетвореннях. Як зазначалось раніше MamB є переносником двовалентних металів як і MamM, але у білку MamM такої особливості не спостерігається.



### 3 РОЗРОБКА СТАРТАП ПРОЕКТУ

#### 3.1 Резюме: конкретизація бізнес ідеї, мети стартапу, об'єкту дослідження, місця розробки у інноваційному ланцюжку цінності

*Бізнес ідея:* створення лікарського засобу на основі дріжджів *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 для терапії онкологічних захворювань.

*Мета наукової розробки:* створення нового способу доставки лікарських препаратів для зменшення негативного впливу та підвищення ефективності лікування.

*Назва розробки:* «Розробка лікарського засобу на основі дріжджів *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 для терапії онкологічних захворювань»

*Суб'єкт замовлення:* Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

*Об'єкт стартапу:* дріжджі *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745. *Місце розробки в інноваційному ланцюжку цінності:* на етапі розробки.

*Продукт наукової розробки:* ЛЗ для цілеспрямованої лікування онкологічних захворювань.

*Технологія:* використання в якості вектора доставки лікарських засобів дріжджів *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 і націлювання їх на місце пухлини, за рахунок природних магнітокерованих властивостей дріжджів *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745.

*Доступність сировинної бази:* дріжджі *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745, вирощені з пробіотичного препарату «Ентерол 250».

*Кваліфікація персоналу:*

1. Розробник – повна вища освіта «Біотехнологія та біотехніка»; знання з курсу «Біоінформатики» для проведення біоінформатичних досліджень.

*Ринок збуту:* фармацевтичні підприємства., науково-дослідні інститути.

*Модель підприємництва:* B2C.

Резюме стартап-проекту наведене у табл. 3.1.

## Резюме стартап-проекту

Показник	Характеристика
1	2
1. Сутність ідеї	Створення нової системи адресної доставки лікарських засобів на основі дріжджів <i>Saccharomyces boulardii</i> CNCM I-745 для терапії онкологічних захворювань.
2. Наявність аналогів або прототипів ідеї	Прототип – розробка СДЛЗ на основі бактерій <i>Magnetococcus marinus</i> MC-1 Політехнічного університету Монреалю (на етапі доклінічних досліджень)
3. Основна потреба, яку задовольнить реалізований стартап	Зменшення негативного впливу на здоров'я людини при лікуванні онкології, збільшення ефективності терапії проти онкологічних захворювань.
4. Ступінь розробленості технології реалізації	На стадії розробки
5. Класифікація продукту стартапу за міжнародною класифікацією товарів	050328 «ліки для людей»
6. КВЕД, до якого може належати дане виробництво	21.20 «Виробництво фармацевтичних препаратів і матеріалів»
7. Очікувана потужність стартапу	Мала
8. За масштабом виробництва	Мала
9. За рівнем спеціалізації	Вузькопрофільне

Продовження Таблиці 3.1

1	2
10. За ресурсами, що споживатимуться	Капіталомістке, інформаційномістке
11. За чисельністю персоналу	Мале
12. Органи управління при реалізації стартапу	Національні
13. Бажане географічне розташування:  1) потужностей стартапу;  2) офісу стартапу;  3) збутової мережі;  4) постачальників сировини та комплектуючих.	1) Київська область  2) м. Київ  3) Обласні центри України  4) Україна, Франція
14. Місце ідеї у ланцюжку цінностей інноваційного процесу	На етапі розробки
15. Гранична корисність ідеї стартапу	Зменшення негативного впливу при лікування онкологічних захворювань, позитивний вплив на організм людини за рахунок використання пробіотиків
16. Бізнес-модель стартапу	B2C
17. Конкуренти вітчизняні (ціна, на якому етапі)	Немає

Продовження Таблиці 3.1

1	2
18. Конкуренти іноземні (ціна, на якому етапі реалізації знаходяться, основні конкурентні переваги, фактори успіху)	Іноваційна розробка на ринку не має конкурентів, подібну нішу може зайняти препарат «DOPOLO» Dr.Reddy's Індія, що являє собою доксорубіцин гідрохлорид пегільованого ліпосомально
19. Ключові 99 фактори успіху стартапу	Безпечність, ефективність, якість
20. Планова кількість продукту розробки для першого етапу реалізації	500 000 одиниць за рік
21. Споживачі на етапі розвитку	Науково-дослідні інститути України
22. Споживачі на етапі зрілості	Міжнародні науково-дослідні інститути онкологічні клініки
23. Конкурентна ціна на продукт стартапу	3292.30 грн
24. Капіталовкладення в бізнес-процеси	19 923 000 грн
25. Джерела фінансування	Власні та запозичені
26. Потенційні постачальники складових компонентів розробки (виділити вітчизняних і закордонних, плановий обсяг замовлень, наявна потужність постачальника)	Виробник штаму дріжджів <i>Saccharomyces boulardii</i> CNCM I-745, Франція. Основні постачальники обладнання та сировини- виробники із Європи

27. Планове місце реалізації результату розробки	Харківське підприємство по виробництву імунобіологічних та лікарських препаратів ЗАТ "Біолік", займається виробництвом ліків для онкохворих
28. Наявність посередників при реалізації	Без посередників
29. Методи просування результатів розробки на ринок	Реклама в спеціалізованих ЗМІ, інформування провізорів аптек та лікарів через медичних представників та на освітньо-наукових заходах, розміщення детальної інформації на сайті компанії-виробника

### 3.2 Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища стартап-проекту. Ключові фактори успіху

Таблиця 3.2

Аналіз загроз і можливостей зовнішнього середовища підприємства

Загрози	Можливості
Політичні	
1. Недостатній рівень підтримання державою наукових розробок ; 2. Внесення змін до чинного законодавства, що регулює питання виробництва фармацевтичних препаратів	1. Іноземні інвестори 2. Вихід на європейський ринок
Економічні	
1. Зростання ціни обладнання та матеріали	1. Монополія на українському ринку; 2. Надходження податків в державу;

2. Ціна препарату вища за купівельну спроможність більшої частини населення	3. Залучення висококваліфікованих кадрів
3. Коливання курсу валюти	
Географія	
1. Немає постачальника вихідної культури м/о.	<p>1. Співпраці із європейськими постачальниками;</p> <p>2. Забезпечення підприємства необхідними енергетичними, паливним ресурсами;</p> <p>3. Зручна транспортна мережа</p> <p>4. Експорт продукції в європейські країни та країни Азії</p>
Демографія	
1. Виїзд потенційних споживачів за кордон	1. Додаткові робочі місця для спеціалістів галузі
Культура	
1. Надання переваги іноземним препаратам даної сфери використання	1. Перспективи розвитку нового виробництва, поширення продукту, розширення сфери впливу на ринки
Науково – технічний прогрес	
1. Вихід на ринок нової компанії по виробництву, втрата сфери впливу	1. Оптимізація виробничого процесу, розробка нових продуктів, покращення продуктивності культури, покращення властивостей продукту

Таблиця 3.3

## Переваги та недоліки зовнішнього оперативного середовища

Переваги	Недоліки
Постачальники	
1. Поставки необхідних матеріалів та обладнання	1. Закупівля культури м/о з-за кордону
Конкурент	
1. Монополія на українському та європейському ринку 2. Конкурентом являється компанія Ліподокс	1. Недовіра до нового виробника серед споживачів
Споживачі	
1. Широкий спектр дії препарату, не патогенність, безпека при вживанні	1. Надання переваги перевіреним виробникам

Таблиця 3.4

## Аналіз зацікавлених сторін

Зацікавлена сторона	Вплив її на реалізацію проєкту	Цікавість її до проєкту	Загальний коефіцієнт впливу на проєкт
1	2	3	4
<b>Зовнішнє оперативне середовище</b>			
Конкурент	Ефективна рекламна компанія	Прибрати з ринку можливого конкурента	0,15

1	2	3	4
Постачальник	Маніпуляція ціни на необхідні складові виробництва	Збільшення поставок	0,15
Споживачі	Обсяги продажів	Основний критерій: невисока ціна-дієвість препарату	0,2
<b>Зовнішнє середовище</b>			
Політичні структури	Вплив політики на розвиток та стабільність виробництва	Надходження податків у бюджет	0,07
Суб'єкти економічного середовища	Економічна ситуація в країні: оподаткування, курс валюти, рівень доходу громадян	Нове джерело надходження коштів	0,23
Суб'єкти географії	Безперебійні та стабільні поставки матеріалів та сировини	-	0,03
Суб'єкти демографії	Від'ємне сальдо міграції, зменшення потенційних покупців	Доступність необхідних ліків	0,17
Суб'єкти культурного середовища	Рекламний аспект	Отримання національного виробника продукції, доступність ліків	0,05
Суб'єкти НТП	Розвиток освіти та технологій, впровадження нових навчальних курсів	Робочі місця	0,05



## Переваги і недоліки внутрішнього середовища

	<b>Переваги</b>	<b>Недоліки</b>
Реклама	Успішна рекламна компанія забезпечить високі продажі	Необхідні значні матеріальні ресурси
Матеріальні витрати	Залучення інвестицій, кредитування	Недостатнє зовнішнє фінансування
Виробництво	Оптимізація виробничого процесу шляхом забезпечення кваліфікованими кадрами та необхідним обладнанням .	Можливі труднощі в побудові та налаштуванні виробничого процесу, що немає аналогів в Україні
Персонал	Достатня кількість кадрів за даною сферою виробництва	Недостатній професіоналізм персоналу
Організація	Пошук спеціалістів з досвідом роботи розробки бізнес моделі, плану підприємства.	Труднощі з налагодженням виробничих потужностей

### 3.3 Визначення ключових факторів успіху проекту

Так як ми маємо лише наближено схожі продукти на нашу пропозицію, порівняння буде лише з ними.

Таблиця 3.6

Оцінка характеристик за методом Шонфільда

Характеристика	Коефіцієнт вагомості характеристики	Оцінка характеристик		
		Наша товарна одиниця	DOPOLO	Doxorubicine - Vista
Ціна	0,20	2	3	1
Терапевтична ефективність	0,20	5	5	5
Якість сировини	0,20	5	4	5
Дотримання вимог GMP	0,20	5	4	5
Рекламна компанія	0,2	2	1	1

Таблиця 3.7

Бальна оцінка характеристик за методом Шонфільда

Характеристика	Бальна оцінка характеристик		
	Наша товарна одиниця	DOPOLO	Doxorubicine -Vista
Ціна	$2 \cdot 0,2 = 0,4$	$3 \cdot 0,2 = 0,6$	$1 \cdot 0,2 = 0,2$
Терапевтична ефективність	$5 \cdot 0,2 = 1$	$5 \cdot 0,2 = 1$	$5 \cdot 0,2 = 1$

Якість сировини	$5*0,2=1$	$4*0,2=0,8$	$5*0,2=1$
Дотримання вимог GMP	$5*0,2=1$	$4*0,2=0,8$	$5*0,2=1$
Рекламна компанія	$2*0,2=0,4$	$1*0,2=0,2$	$1*0,2=0,2$

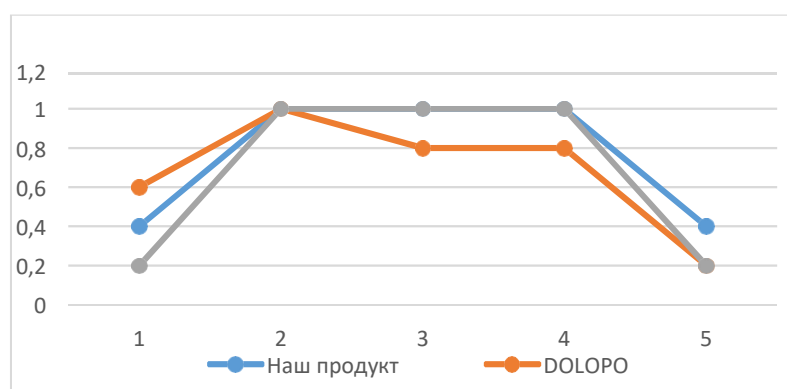


Рисунок 3.1 – Порівняння конкурентних переваг підприємства з конкурентами

Таблиця 3.8

### Варіанти розвитку стартапу

Варіант	Стислий опис можливого розвитку
Продаж бізнес-ідеї	Найвіродніший варіант, фармація і фамакологія дорогівартісні і наукомісткі галузі. Інноваційна ідея має високу ціну на ринку. При професійній роботі із розробкою, можна отримати значний прибуток, але для цього необхідні знання і відповідна кваліфікація. Контракт можна заключити на певну суму або відсоток від прибутку як автор ідеї.
Впровадження у виробництво	Дороговартісний варіант. Можливий лише при значних фінансових вкладах. Фармація жорстко контролюється на предмет якості. Великих зусиль коштує не тільки організація виробництва, а й офіційне оформлення.

Керування проектом	Варіант при якому можна продати проект, але отримати керівну посаду у розробці чи на підприємстві. Схожий на перший варіант, але робота на проектом триває під наглядом розробника.
Партнерство	При достатньому фінансовому стані можна продати проект великій компанії і отримати частку у бізнесі, не матимемо відношення до розвитку ідеї

### 3.4. Визначення потенційних споживачів

Таблиця 3.9

#### Класифікація потенційних споживачів

Критерій	Значення
<b>Юридична особа</b>	
Форма власності	Приватні
КВЕД	86.22 Спеціалізована медична практика 47.73 Роздрібна торгівля фармацевтичними товарами в спеціалізованих магазинах
За рівнем спеціалізації	Комбіноване
За чисельністю персоналу	Середні
За сферою діяльності	Виробниче
За приналежністю капіталу і контролю	Національне, іноземне
За віддаленістю органів управління	Національне
За рівнем технологічної цілісності	Провідне, філія

За долею іноземного капіталу	Інвестиційне, без інвестицій
За формуванням статутного капіталу	Унітарне, корпоративне
За роботою протягом року	Позасезонне
За географічним розташуванням на території України	По території держави

Таблиця 3.10

### Потенційні споживачі продукту

	Споживач	Потреби, що задовольняє продукт
1	Медичні заклади	Стаціонарне лікування хворих
2	Індивідуальні потреби пацієнта	Проходження курсу лікування вдома
3	Мережі аптек	Реалізація продукту, одержання доходу

Таблиця 3.11

### Паспорт потенційного клієнта

Характеристика	Значення
Організаційно-правова форма	Приватне п-/п
Чисельність персоналу	Середня
Розташування	Реалізація продукту на території України

Вид продукту, який потрібен даному споживачеві	Фарм. препарат
Призначення придбаного товару	Застосування при лікуванні
Потенційний обсяг споживання продукції	До 64000 од./ місяць

Таблиця 3.12

Запланований обсяг реалізації стартап-продукту за перший рік виробництва

	Серпень 2023	Вересень 2023	Жовтень 2023	Листопад 2023	Грудень 2023	Січень 2024	Лютий 2024	Березень 2024	Квітень 2024	Травень 2024	Червень 2024	Липень 2024
План, кількість од.	4 000	8 000	11 000	24 000	34 000	45 000	54 000	64 000	64 000	64 000	64 000	64 000

### 3.5. Ціна інноваційної пропозиції на ринку

1. Витратний метод:

$$Ц = 560 + 20\% = 700 \text{ грн}$$

2. Параметричний метод

Таблиця 3.13

Розрахунок ціни продукту за параметричним методом

Продукт	Параметри						Ціна
	Якість		Ефективність		Безпека препарату		
	Бали	КВ*	Бали	КВ*	Бали	КВ*	
							$668 / (5 * 0,3 + 4 * 0,3 + 5 * 0,4) = 140$
DOLOPO	5	0,3	4	0,3	5	0,4	668
Продукт	5	0,3	5	0,3	5	0,4	$140 * (5 * 0,3 + 5 * 0,3 + 5 * 0,4) = 700$ грн

Таблиця 3.14

### Проектні ціна та обсяги продажу продукції

Планові обсяги продажу		Аналоги, прототипи	
Кількість, од.	Ціна, грн/од.	Кількість, од.	Ціна, грн/од.
500 000	700	1 000 000	668

### 3.6. Концепція бізнес-моделі проекту та карта бізнес-процесів реалізації проекту

<p>Ключові партнери:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- виробник бактеріального штаму <i>Saccharomyces boulardii</i> CNCM I-</li> </ul>	<p>Ключові види діяльності:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- виробництво лікарських засобів;</li> </ul>	<p>Клієнти:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- онкологічні лікарні;</li> <li>- аптеки.</li> </ul>	<p>Методи просування на ринку:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- реклама продукту в спеціалізованих ЗМІ, публікації досліджень у наукових журналах;</li> </ul>
---	---	---	---

<p>745 (<i>Biocodex</i>, Франція)</p> <p>- виробники обладнання для цехів («AIRPAC EXPORTS», Індія);</p> <p>- постачальник обладнання для лабораторій («Mettler Toledo», Швейцарія);</p> <p>- виробники сировинних матеріалів («Еліпс Україна»)</p>	<p>- оптовий продаж готової продукції.</p>		<p>- використання медичних представників для привернення уваги аптек до препарату;</p> <p>- організація освітньо-наукових заходів;</p> <p>- розміщення детальної інформації на сайті компанії-виробника;</p> <p>- співпраця з лікарями онкологічних шпиталів з метою привернення уваги до препарату.</p>
	<p>Ключові ресурси:</p> <p>- людські;</p> <p>- фінансові;</p> <p>- матеріальні.</p>	<p>Проблеми споживачів, що вирішує розробка:</p> <p>Відносно безпечно та ефективно лікування меланоми шкіри за допомогою інноваційних методик</p>	
	<p>Ключові фактори успіху:</p> <p>- ефективність.</p>		

Таблиця 3.16

Карта бізнес-процесів виконання стартап-проекту

<p>Стадія реалізації</p> <p>стартап проекту</p>	<p>Бізнес-процеси</p>	<p>Характеристики</p>		
		<p>Задіяні ресурси</p>	<p>Орієнтовна тривалість процесу, год</p>	<p>Верхня межа фінансових витрат, грн</p>



Розробка ідеї стартапу	Створення ідеї	Людські, фінансові	60	2 500
	Формування команди		80	2 000
	Аналіз ринку		120	12 000
	Проектування виробництва		200	35 000
	Розробка бізнес- плану		140	18 000
Реалізація ідеї стартапу	Реєстрація суб'єкта господарчої діяльності	Людські, фінансові	80	4000
	Реєстрація торгової марки		70	2500
	Отримання дозволу на побудову виробництва		120	5000
	Заключення договору про намір з банком		40	2500
	Заключення договору про намір з мережею збуту		40	2500

	Заключення договору про намір з поставниками сировини та обладнання		40	2500
Впровадження у виробництво	Запуск договорів	Людські, фінансові, матеріальні	30	500
	Проведення будівничих робіт та технічного оснащення		650	18 900 000
	Проведення налаштувальних робіт		190	250 000
	Виготовлення першої партії продукції		72	175 000
	Сертифікація продукції та виробництва		12	6000
Масова реалізація	Проведення рекламної кампанії	Людські, фінансові	300	500 000

	Підготовка документації для участі у тендерних закупівлях		80	3000
Всього			2324	19 923 000

Таблиця 3.17

Системний аналіз бізнес-процесів стартапу

Функції	Елементи			
	Розробник	Провідні спеціалісти	Виробничий персонал	Спеціалісти з контролю якості
Розробка ідеї	+			
Формування команди	+	+		
Аналіз ринку	+	+		
Проектування виробництва	+	+		
Розробка бізнес-плану	+	+		
Реєстрація суб'єкта господарчої діяльності		+		
Реєстрація торгової марки		+		

Отримання дозволу на побудову виробництва		+		
Заклучення договору про намір з банком		+		
Заклучення договору про намір з мережею збуту		+		
Заклучення договору про намір з поставниками сировини та обладнання		+		
Запуск договорів	+	+		
Проведення будівничих робіт та технічного оснащення			+	+
Проведення налаштувальних робіт			+	+
Виготовлення першої партії продукції			+	+
Сертифікація продукції та виробництва	+	+		+
Проведення рекламної кампанії		+		
Підготовка документації для участі у тендерних закупівлях		+		+

### 3.7. Ризики стартап-проекту та методи управління ними

Таблиця 3.18

#### Ризики інноваційної розробки

Назва процесу / стадії реалізації стартап проекту	Бізнес-процеси	Зовнішні ризики	Внутрішні ризики
Розробка ідеї стартапу	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ознайомлення з ринком продукту</li> <li>2. Складання бізнес плану</li> <li>3. Пошук виробників обладнання та матеріалів</li> <li>4. Складання кошторису проекту</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Нестача фінансування</li> <li>2. Не рентабельність виробництва</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Неправильні розрахунки проекту</li> </ol>
Реалізація ідеї	<ol style="list-style-type: none"> <li>5. Отримання необхідних ресурсів для побудови виробництва</li> <li>6. Придбання обладнання та матеріалів</li> <li>7. Набір працівників</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Недостатнє фінансове забезпечення</li> <li>2. Зростання ціни на обладнання та матеріали</li> <li>3. Не проходження процесу отримання сертифікату</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Не кваліфікований персонал</li> <li>2. Нестача комплектуючих для виробництва</li> <li>3. Проблеми із побудовою підприємства</li> </ol>

Впровадження у виробництво	8. Випуск першої партії продукту 9. Покращення технологічного процесу	1. Неefективна робота лінії 2. Не висока продуктивність культури	1. Зупинка виробництва через погану роботу персоналу та обладнання 2. Нестача сировини та матеріалів для в-ва
Масова реалізація	10. Вихід на нові ринки 11. Автоматизація виробництва	1. Прості роботи виробництва 2. Невеликі замовлення продукції	1. Банкруцтво 2. Пошук нових постачальників 3. Зменшення прибутку

Таблиця 3.19

Матриця оцінки ризиків

За впливом ризиків на очікуваний результат		За ймовірністю настання ризиків		
Критерій ризику	Числове значення	Низька ймовірність	Середня ймовірність	Висока ймовірність
		1	2	3
Високий рівень впливу	3	3*L	6*F,Q	9*A,R
Середній рівень впливу	2	2*N	4*D,G,I,T	6*B,C
Низький рівень впливу	1	1*M,N,P,S	2*O	3*E

## План заходів з управління ризиками

<b>Назва ризику</b>	<b>Назва методу управління ризиком</b>	<b>Відповідальні Виконавці</b>	<b>Період виконання / застосування методу</b>	<b>Очікувані результати від впровадження методів управління</b>
Нестача фінансування	Попередження ризику	Бухгалтер	Розробки та реалізації ідеї	Пошук інвесторів
Не рентабельність виробництва	Попередження ризику	Економіст, директор	реалізація	Перекриття поточним доходом
Нестача сировини та матеріалів для в-ва	Попередження ризику	Начальник виробництва	Стадія виробництва	Створення резерву
Банкрутство	Прийняття ризику (самострахування)	Головний економіст, директор	Масова реалізація	Фінансова подушка
Неефективна робота лінії	Попередження ризику	Інженер з обслуговування та ремонту обладнання, начальник виробництва	Масова реалізація	Періодична перевірка роботи обладнання

## ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ ДО ДИСЕРТАЦІЇ

- На основі огляду літератури з'ясовано, що магнітотаксисні бактерії і пробіотики використовуються у біомедичній галузі як вектори для спрямованої доставки генів та ліків в орган-мішень, а також в області зеленого синтезу наночастинок.
- Методами порівняльної геноміки визначено, що всі обрані пробіотичні мікроорганізми є потенційними продуцентами біогенних магнітних наночастинок (БМН). При цьому ці мікроорганізми можна розділити на 4 групи за наборами гомологів mam-білків: 1) мікроорганізм, який має гомологи білків mamB, mamM, і не має гомологів білків mamA, mamO, mamE: *Aspergillus niger* CBS 513.88, є потенційним продуцентом зовнішньоклітинних аморфних БМН; 2) мікроорганізми, які мають гомологи білків mamA, mamB, mamM, і не мають гомологів білків mamO, mamE: *Saccharomyces boulardii* Seguela, Bastide & Massot, 1984, *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745, *Saccharomyces cerevisiae* S288C, є потенційними продуцентами зовнішньоклітинних кристалічних БМН; 3) мікроорганізми, які мають гомологи білків mamB, mamM, mamO, mamE і не мають гомологу білку mamA: *Lactobacillus casei ssp. casei* CCM 7088, *Escherichia coli* Nissle 1917, *Lactobacillus plantarum* JDM1, *L. acidophilus* 58p B6T7, *L. casei* (strain JCM1134), є потенційними продуцентами внутрішньоклітинних аморфних БМН; 4) мікроорганізми, які мають гомологи білків mamA, mamB, mamM, mamO, mamE: *Staphylococcus aureus* NCTC 8325, *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Pseudomonas stutzeri* A150, *Brevibacterium casei*, *Bacillus cereus* 10876, *Bacillus licheniformis* DSM 13, *Lactobacillus fermentum* ATCC 14931, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820, *Lactobacillus* sp. Lact08 from Yoghurt cells, *L. delbrueckii* subsp. bulgaricus isolated from probiotic curd, *Bacillus subtilis* 168, *Escherichia coli* k12, *Lactobacillus kimchicus* DCY51T isolated from Korean kimchi, *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079, є потенційними продуцентами внутрішньоклітинних кристалічних БМН.



- На основі розрахунку фізико-хімічних властивостей *mat*-білків обраних для дослідження магнітотаксисних бактерій встановлено, що білки *matB*, *matM* є стабільними (мають індекс нестабільності в діапазоні 20-37), їх ізoeлектрична точка варіюється від кислого до лужного рН (в діапазоні 4-8); білок *matA* є стабільним для більшості МТБ і нестабільним для окремих МТБ (має індекс нестабільності в діапазоні 18-42), його ізoeлектрична точка варіюється від кислого до лужного рН (в діапазоні 4.5-8); білок *matO* є стабільним (має індекс нестабільності в діапазоні 31-34), його ізoeлектрична точка варіюється від кислого до лужного рН (в діапазоні 4.5-8.5); білок *matE* є стабільним для більшості МТБ і нестабільним для окремих МТБ (має індекс нестабільності в діапазоні 28-48), його ізoeлектрична точка варіюється від слабо кислого до лужного рН (в діапазоні 6-10); ці властивості *mat*-білків є важливими при підборі тривалості та рН середовища при їх використанні, зокрема, для зеленого синтезу наночастинок. На основі розрахунку фізико-хімічних властивостей гомологів *mat*-білків магнітотаксисних бактерій у протеомах обраних для досліджень пробіотичних мікроорганізмів встановлено, що у мікроорганізмів четвертої групи такі фізико-хімічні властивості гомологів *mat*-білків як індекс нестабільності, частка типів вторинної структури та молекулярна вага збереглися найкраще в порівнянні з діапазоном значень відповідних властивостей гомологічних білків МТБ.
- Розроблено стартап-проект.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Ali A, Review on Recent Progress in Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Diverse Appl. *Front Chem.* 2021;
2. Mohamed, A. E.-M. A., and Mohamed, M. A.. Nanoparticles: Magnetism and Appl. in Magnetic Nanostructures, *Springer*, 2019, 1–12.
3. Soni V et el. Sustainable and green trends in using plant extracts for the synthesis of biogenic metal nanoparticles toward environmental and pharmaceutical advances: A review. *Environ Res.* 2021.
4. Komeili A. Molecular mechanisms of compartmentalization and biomineralization in magnetotactic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2012 Jan;36(1):232-55.
5. Ben-Shimon S, Stein D, Zarivach R. Current view of iron biomineralization in magnetotactic bacteria. *J Struct Biol X.* 2021 Oct 13
6. Gorobets O.Yu. Biogenic magnetic nanoparticles: Biomineralization in prokaryotes and eukaryotes: Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology, Third Edition. – CRC Press: New York. – 2014. – P. 300-308.
7. Gorobets O. Physiological origin of biogenic magnetic nanoparticles in health and disease: from bacteria to humans, *International Journal of Nanomedicine.* – Vol. 12. – P. 4371-4395. – 2017;
8. Mendi A. et al. Lactobacillus rhamnosus could inhibit Porphyromonas gingivalis derived CXCL8 attenuation, *Journal of Applied Oral Science.* 2016. Vol. 24, № 1. P. 67–75
9. Saarela M. et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties, *Journal of Biotechnology.* 2000. Vol. 84, № 3. P. 197–215
10. Duong M.T.-Q. et al. Bacteria-cancer interactions: bacteria-based cancer therapy, *Experimental & Molecular Medicine.* 2019. Vol. 51, № 12. P. 1–15

11. Zhou S. et al. Tumour-targeting bacteria engineered to fight cancer, *Nature Reviews Cancer*. 2018. Vol. 18, № 12. P. 727–743
12. Tangney M. Gene therapy for cancer: dairy bacteria as delivery vectors. *Discovery medicine*. 2010. Vol. 10, № 52. P. 195–200
13. Bazylinski, D.A.; Frankel, R.B. Magnetosome formation in prokaryotes. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004. № 2. P. 217–230.
14. Frankel, R.B.; Bazylinski, D.A. How magnetotactic bacteria make magnetosomes queue up. *Trends Microbiol.* 2006. №14.P. 329–331.
15. Lower, B.H.; Bazylinski, D.A. The bacterial magnetosome: A unique prokaryotic organelle. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2013. № 23. P. 63–80.
16. Vargas G, Cypriano J, Correa T, Leão P, Bazylinski DA, Abreu F. Applications of Magnetotactic Bacteria, Magnetosomes and Magnetosome Crystals in Biotechnology and Nanotechnology: Mini-Review. *Molecules*. 2018 . Vol.23, № 10. P. 2438.
17. Schuler D, Frankel RB. Bacterial magnetosomes: microbiology, biomineralization and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1999. № 52. P.464–473.
18. Berson AE, Hudson DV, Waleh NS. Cloning of a sequence of *Aquaspirillum magnetotacticum* that complements the *aroD* gene of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* . 2006. Vol. 5, №9. P.2261–2264.
19. Grunberg K, Wawer C, Tebo BM, Schu" ler D. A large gene cluster encoding several magnetosome proteins is conserved in different species of magnetotactic bacteria. *Appl Environ Microbiol.*2001. № 6. P.4573–4582.
20. Murat D, Quinlan A, Vali H, Komeili A. Comprehensive genetic dissection of the magnetosome gene island reveals the step-wise assembly of a prokaryotic organelle. *Journal PNAS*. 2018. Vol.107, № 12. P. 5593–5598.
21. Lefèvre CT, Abreu F, Lins U, Bazylinski DA. A bacterial backbone: magnetosomes in magnetotactic bacteria. In: Rai M, Duran N, editors. *Metal nanoparticles in microbiology*. Berlin: Springer-Verlag 2011. P. 75–102.

22. Baumgartner J, Faivre D. Magnetite biomineralization in bacteria. *Prog Mol Subcell Biol* . 2011. Vol.52, № 11. P. 3–27.
23. Komeili A. Molecular mechanisms of compartmentalization and biomineralization in magnetotactic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2012. Vol.36, № 1. P.232–55.
24. Scheffel A, Schüler D. Magnetosomes in magnetotactic bacteria. In: Shively J, editor. Complex intracellular structures in prokaryotes. *Berlin: Springer-Verlag*. 2016. P. 167–91.
25. Martel, S. Targeting active cancer cells with smart bullets. *Ther. Deliv.* 2017. № 8. P. 301–312.
26. Felfoul, O.; Mohammadi, M.; Taherkhani, S.; De Lanauze, D.; Xu, Y.Z.; Loghin, D.; Essa, S.; Jancik, S.; Houle, D.; Lafleur, M.; et al. Magneto-aerotactic bacteria deliver drug-containing nanoliposomes to tumour hypoxic regions. *Nat. Nanotechnol.* 2016. № 11. P. 941–947/
27. Martel, S. Targeting active cancer cells with smart bullets. *Ther. Deliv.* 2017, 8, 301–312.
28. Sun, J.; Li, Y.; Liang, X.J.; Wang, P.C. Bacterial magnetosome: A novel biogenetic magnetic targeted drug carrier with potential multifunctions. *J. Nanomater* .2011. P. 469031–469043.
29. Sun, J.B.; Duan, J.H.; Dai, S.L.; Ren, J.; Guo, L.; Jiang, W.; Li, Y. Preparation and anti-tumor efficiency evaluation of doxorubicin-loaded bacterial magnetosomes: Magnetic nanoparticles as drug carriers isolated from *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Biotechnol. Bioeng.* 2008. № 101.P. 1313–1320.
30. Long, R.; Liu, Y.; Dai, Q.; Wang, S.; Deng, Q.; Zhou, X. A natural bacterium-produced membrane-bound nanocarrier for drug combination therapy. *Materials* 2016. № 9. P. 889.
31. Liu, M.; Huang, G.; Cong, Y.; Tong, G.; Lin, Z.; Yin, Y.; Zhang, C. The preparation and characterization of micelles from poly ( $\gamma$ -glutamic acid)-graft-

- poly(l-lactide) and the cellular uptake thereof. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2015. №26. P.187.
32. Guan, F.; Li, X.; Guo, J.; Yang, G.; Li, X. Ganglioside-magnetosome complex formation enhances uptake of gangliosides by cells. *Int. J. Nanomed.* 2015. № 10 P. 6919–6930.
  33. Wang, X.; Wang, J.G.; Geng, Y.Y.; Wang, J.J.; Zhang, X.M.; Yang, S.S.; Jiang, W.; Liu, W.Q. An enhanced anti-tumor effect of apoptin-cecropin b on human hepatoma cells by using bacterial magnetic particle gene delivery system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018. №. 496.P.719–725
  34. Guan F, Li X, Guo J, Yang G, Li X. Ganglioside-magnetosome complex formation enhances uptake of gangliosides by cells. *Int J Nanomedicine.* 2015 Nov 6 10:6919-30.
  35. Ozen M, Dinleyici EC. The history of probiotics: the untold story. *Benef Microbes.* 2015. №. 6. P.59–65.
  36. Fijan S. Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *Int J Environ Res Public Health.* 2014. №11. P.4745–67.
  37. Fuller, R. Probiotics in Human Medicine. *Journal Gut.* 1991. №32.P. 439–442.
  38. Morelli, L.; Capurso, L. FAO/WHO Guidelines on Probiotics: 10 Years Later. *J. Clin. Gastroenterol.* 2012. №46. P.S1–S2.
  39. George Kerry R, Patra JK, Gouda S, Park Y, Shin HS, Das G. Benefaction of probiotics for human health: a review. *J Food Drug Anal.* 2018. №26. P.927–39.
  40. Miller LE, Ouwehand AC, Ibarra A. Effects of probiotic-containing products on stool frequency and intestinal transit in constipated adults: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Gastroenterol.* 2017. № 30. P.629–639.
  41. Ettinger G, MacDonald K, Reid G, Burton JP. The influence of the human microbiome and probiotics on cardiovascular health. *Gut Microbes.* 2014. №5. P. 719–728.

42. Nwosu FC, Avershina E, Wilson R, Rudi K. Gut microbiota in HIV infection: implication for disease progression and management. *Gastroenterol Res Pract*. 2014. doi: 10.1155/2014/803185.
43. Islam SU. Clinical Uses of Probiotics. *Medicine*. 2016. Vol. 95, № 5. DOI: 10.1097/MD.0000000000002658.
44. Boyle RJ, Robins-Browne RM, Tang ML. Probiotic use in clinical practice: what are the risks? *Am J Clin Nutr*. 2006. № 83. P.1256–64.
45. Burkhardt O, Köhnlein T, Pletz M, Welte T. *Saccharomyces boulardii* induced sepsis: successful therapy with voriconazole after treatment failure with fluconazole. *Scand J Infect Dis*. 2005. Vol. 37, №1. P.69-72.
46. Tsai YL, Lin TL, Chang CJ, Wu TR, Lai WF, Lu CC, et al. Probiotics, prebiotics and amelioration of diseases. *J Biomed Sci*. 2019. Vol.26, №3. DOI: 10.1186/s12929-018-0493-6.
47. Banu H, Sethi DK, Edgar A, et al. Doxorubicin loaded polymeric gold nanoparticles targeted to human folate receptor upon laser photothermal therapy potentiates chemotherapy in breast cancer cell lines. *J Photochem Photobiol B*. 2015. № 149. P.116–128.
48. Kleinstreuer C, Childress E, Kennedy A. Chapter 10 – Targeted drug delivery: multifunctional nanoparticles and direct micro-drug delivery to tumors. *Transport in Biological Media*. Boston: Elsevier. 2013. P.391–416.
49. Fahim, H.A.; Khairalla, A.S.; El-Gendy, A.O. Nanotechnology: A Valuable Strategy to Improve Bacteriocin Formulations. *Front. Microbiol*. 2016, 7, 1385
50. Bekiaridou, A.; Karlafti, E.; Oikonomou, I.M.; Ioannidis, A.; Papavramidis, T.S. Probiotics and Their Effect on Surgical Wound Healing: A Systematic Review and New Insights into the Role of Nanotechnology. *Nutrients*. 2021. № 13. P.4265.
51. Cao ZP, Liu JY. Bacteria and bacterial derivatives as drug carriers for cancer therapy. *J Control Release*. 2020. №.326. P.396–407.

52. Agrawal N, Bettegowda C, Cheong I, et al. Bacteriolytic therapy can generate a potent immune response against experimental tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004. Vol.101, № 42. P. 15172.
53. Leventhal DS, Sokolovska A, Li N, et al. Immunotherapy with engineered bacteria by targeting the STING pathway for anti-tumor immunity. *Nat Commun*.2020. Vol.11, № 1. P.2739.
54. Ye Z, Liang L, Lu H, Shen Y, Zhou W, Li Y. Nanotechnology-Employed Bacteria-Based Delivery Strategy for Enhanced Anticancer Therapy. *Int J Nanomedicine*. 2021. №16. P. 8069-8086.
55. Pathak, S., Verma, R., Singhal, S., Chaturvedi, R., Kumar, P., Sharma, P. Spin Dynamics Investigations of Multifunctional Ambient Scalable Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Surface Decorated ZnO Magnetic Nanocomposite Using FMR. *Scientific Rep*. 2021. № 11. P.1–12.
56. Duan, M., Shapter, J. G., Qi, W., Yang, S., and Gao, G. Recent Progress in Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Properties, and Applications. *Nanotechnology*. №29. doi: 10.1088/1361-6528/aadcec.
57. Koul, B.; Poonia, A.K.; Yadav, D.; Jin, J.-O Microbe-Mediate, Biosynthesis of Nanoparticles: Applications and Future Prospects. *Biomolecules*. 2021. № 11.P. 886.
58. Singh, P.; Kim, Y.-J.; Zhang, D.; Yang, D.-C. Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. *Trends Biotechnol*. 2016. № 34. P. 588–599.
59. Gahlawat, G.; Choudhury, A.R. A review on the biosynthesis of metal and metal salt nanoparticles by microbes. *RSC Adv*. 2019. №9. P.12944–12967
60. Kulkarni, Narendra & Muddapur, Uday. Biosynthesis of Metal Nanoparticles: A Review. *Journal of Nanotechnology*. 2014. P. 1-8.
61. K. Jha and K. Prasad, Biosynthesis of metal and oxide nanoparticles using Lactobacilli from yoghurt and probiotic spore tablets. *Biotechnology Journal*. 2010. Vol. 5, № 3, P.85–291.

62. R. Usha, E. Prabu, M. Palaniswamy, C. K. Venil, and R. Rajendran, Synthesis of metal oxide nano particles by *Streptomyces* sp for development of antimicrobial textiles. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry*. 2010. Vol. 5, № 3. P. 153–160.
63. Z. H. Dhoondia and H. Chakraborty, Lactobacillus mediated synthesis of silver oxide nanoparticles, acillus mediated synthesis of silver oxide nanoparticles. *Nanomaterials and Nanotechnology*. 2012. Vol. 2, №15. <https://doi.org/10.5772/55741>.
64. G. Sagar and B. Ashok, Green synthesis of silver nanoparticles using *Aspergillus niger* and its efficacy against human pathogens. *European Journal of Experimental Biology*. 2012. Vol. 2, № 5. P.1654–1658.
65. K. Prasad and K. Anal Jh. ZnO nanoparticles: synthesis and adsorption study. *Natural Science*. 2009. Vol. 1, № 2. P. 129–135.
66. K. Natarajan, S. Selvaraj, and V. R. Murty. Microbial production of silver nanoparticles. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 2010. Vol. 5, №1. P. 135–140.
67. V. Ca, S. Hiremath, M. N. Chandraprabhab et al. Green synthesis of ZnO nanoparticle. *International Journal of Current Engineering and Technology*. 2013. № 1. P. 118-120.
68. Fassler J. BLAST . *National Center for Biotechnology Information*. 2008. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK62051/>.
69. Stover N. A. Using NCBI BLAST. *Curr. Protoc. Essential Lab. Tech*. 2017. №14. P. 11-24.
70. Wei Lin et al. Genomic expansion of magnetotactic bacteria reveals an earlycommon origin of magnetotaxis with lineage-specific evolution. *The ISME Journal* . 2018. № 12. P.1508–1519. [doi.org/10.1038/s41396-018-0098-9](https://doi.org/10.1038/s41396-018-0098-9).
71. Schübbe S., Würdemann C., Peplies J. Transcriptional Organization and Regulation of Magnetosome Operons in *Magnetospirillum grphiswaldense*. *Appl. Environ. Microbiol*. 2006. Vol. 72, № 9. P. 5757—5765.



72. Jeff Chang et al, Biopython Tutorial and Cookbook, Last Update . 2021 (Biopython 1.79). URL: <http://biopython.org/DIST/docs/tutorial/Tutorial-1.79.pdf>
73. Protein Sequence. URL: <https://biopython.org/wiki/ProtParam>. (Дата звернення: 27.04.22).
74. Й. Опейда, О. Швайка. Глосарій термінів з хімії. – Донецьк: «Вебер», 2008. - 758 с.
75. Lobry JR, Gautier C. Hydrophobicity, expressivity and aromaticity are the major trends of amino-acid usage in 999 Escherichia coli chromosome-encoded genes. *Nucleic Acids Res.* 1994;22(15):3174-3180.
76. Vihinen M, Torkkila E, Riihonen P. Accuracy of protein flexibility predictions. *Proteins.* 1994 Jun;19(2):141-9.
77. Dunker A.K. et al. Intrinsically disordered protein. *J Mol Graph Model.* 2001;19(1):26-59.
78. Schulz, P. A. et al., Multiphoton dissociation of polyatomic molecules. *Annual Review of Physical Chemistry*, 30(1), 379-409.
79. Dunker, A. Keith, et al. Protein disorder and the evolution of molecular recognition: theory, predictions and observations. *Pac Symp Biocomput.* Vol. 3. 1998.
80. Smith DK, Radivojac P, Obradovic Z, Dunker AK, Zhu G. Improved amino acid flexibility parameters. *Protein Sci.* 2003 May;12(5):1060-72.
81. Guruprasad K, Reddy BV, Pandit MW. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Eng.* 1990 Dec;4(2):155-61.
82. Rogers S, Wells R, Rechsteiner M. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science.* 1986 Oct 17;234(4774):364-8.
83. Li W, Pio F, Pawłowski K, Godzik A. Saturated BLAST: an automated multiple intermediate sequence search used to detect distant homology. *Bioinformatics.* 2000 Dec;16(12):1105-10. doi: 10.1093/bioinformatics/16.12.1105. Gorobets O.Yu. Biomineralization and synthesis of biogenic magnetic nanoparticles and

- magneto-sensitive inclusions in microorganisms and fungi. *Functional Materials*. 2014. № 4. P. 15-21. URL: <http://dx.doi.org/10.15407/fm21.04.427>.
84. M. Vainshtein, N. Suzina, E. Kudryashova, E. Ariskina New magnet-sensitive structures in bacterial and archaeal cells . *Biology of the Cell*. 2002. P. 29–35.
  85. S.V. Gorobets, O.Yu. Gorobets, I.V. Sharau, Yu.V. Milenko, Magnetically controlled vector based on E coli Nissle 1917. 2020.
  86. G. Sagar and B. Ashok, Green synthesis of silver nanoparticles using *Aspergillus niger* and its efficacy against human pathogens. *European Journal of Experimental Biology*. 2012. Vol. 2, № 5, P.1654–1658.
  87. Korbekandi H, Jouneghani RM, Mohseni S, Pourhossein M, Iravani S. Synthesis of silver nanoparticles using biotransformations by *Saccharomyces boulardii*. 2014. Vol.3. P.271-277.
  88. Garmasheva I, Kovalenko N, Voychuk S, Ostapchuk A, Livins'ka O, Oleschenko L. Lactobacillus species mediated synthesis of silver nanoparticles and their antibacterial activity against opportunistic pathogens in vitro. *BioImpacts*. 2016. Vol. 6, №4. P.219.
  89. Mohd Yusof H, Mohamad R, Zaidan UH, Rahman NA. Sustainable microbial cell nanofactory for zinc oxide nanoparticles production by zinc-tolerant probiotic *Lactobacillus plantarum*. *Microb Cell Fact*. 2020. Vol.19, №1 P.1
  90. Guruprasad K, Reddy BV, Pandit MW. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting *in vivo* stability of a protein from its primary sequence. *Protein Eng*. 1990 Dec;4(2):155-61.