

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»
Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології та біофармації**

«На правах рукопису»
УДК 615.33.012:[604.6:582.683.2](043.3)

До захисту допущено
Завідувач кафедри
Валентина ПОЛІЩУК
(підпис) (ініціали, прізвище)
«12» грудня 2025 р.

Магістерська дисертація
на здобуття ступеня магістра
за освітньо-професійною програмою «Біотехнології»
зі спеціальності 162 – Біотехнології та біоінженерія
на тему «Синтез рекомбінантних терапевтичних білків
у рослинах роду *Brassica*»

Виконала:
студентка II курсу, групи БТ-341мп
Удовенко Юлія Русланівна _____

Науковий керівник:
Старший викладач каф. промислової біотехнології та біофармації, к.б.н
Овчаренко Ольга Олександрівна _____

Консультант з старт-апу:
доц. каф. економіки та підприємництва, к.е.н., доц.
Погребняк Анна Юріївна _____

Рецензент:
Заступник директора з наукової роботи ІКБГІ НАН України,
доктор наук, член-кореспондент НАН України
Моргун Богдан Володимирович _____

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

Київ – 2025

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут
імені Ігоря Сікорського»

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології та біофармації

Рівень вищої освіти другий (магістерський)

Спеціальність 162 – Біотехнології та біоінженерія

Освітньо-професійна програма Біотехнології

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри промислової
біотехнології та біофармації

_____ Валентина ПОЛІЩУК
(підпис) (ініціали, прізвище)

«01» вересня 2025 р.

ЗАВДАННЯ

на магістерську дисертацію студентці

Удовенко Юлії Русланівні

1. Тема дисертації Синтез рекомбінантних терапевтичних білків у
рослинах роду *Brassica*

науковий керівник дисертації Овчаренко Ольга Олександрівна
к.б.н., старший викладач,

затверджені наказом по університету від « 28 » жовтня 2025 р. № 4672-с

2. Термін подання студенткою дисертації « 15 » грудня 2025 р.

3. Об'єкт дослідження трансгенна капуста кале *B.oleracea L, spp. acephala*
DC, var *sabellica* L. (сорт «Кадет»), що експресує рекомбінантний поліпептид М.

4. Вихідні дані трансгенні рослини T₀, T₁ та T₂ покоління зі вставкою гена
ста під контролем промотора CaMV 35S з невідомою активністю поліпептиду М
та вмістом білка; висушена біомаса, отримана з трансгенних рослин T₀ та T₁п
покоління з невідомою активністю поліпептиду М.

5. Перелік завдань, які потрібно розробити

основна частина

- провести літературний аналіз щодо експресії поліпептиду у різних
рослинних системах;

- дослідити особливості спадкування гена поліпептиду М у T₁ та T₂
поколіннях трансгенних рослин;

- оцінити вплив умов культивування на активність поліпептиду М у рослин T₀, T₁
та T₂ покоління;

- дослідити стабільність зберігання рослинних екстрактів, що містять коліцин М;

- оцінити вплив режиму висушування на активність коліцину М при тривалому та короткочасному зберіганні;

- змодельовати використання порошку висушеної біомаси трансгенних рослин для обробки зерна проти *E. coli*.

економічна частина

- розробити стартап проєкт

6. Орієнтовний перелік публікацій 3 тез конференцій, 1 оглядова стаття

7. Консультанти розділів дисертації

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Стартап проєкт	Погребняк А. Ю. доц.		

8. Дата видачі завдання 01 вересня 2025 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів виконання дисертації	Термін виконання етапів	Примітка
1	Аналіз літератури за обраною темою	01.09.25 – 06.10.25	
2	Підготовка продуцента для досліджень: напрацювання біомаси рослин	01.09.25 – 10.10.25	
3	Дослідження особливостей спадкування гену коліцину М у нащадках T ₁ та T ₂ покоління	10.10.25 – 06.10.25	
4	Визначення активності коліцину М та вмісту білка у рослинах, що культивуються в умовах <i>in vitro</i> та у теплиці	10.11.25 – 21.11.25	
5	Дослідження активності коліцину М при його зберіганні у вигляді екстрактів	14.10.25 – 19.10.25	
6	Дослідження активності коліцину М при його зберіганні у вигляді висушеної біомаси	01.11.25 – 10.11.25	
7	Моделювання використання висушеної біомаси (прототип кормової добавки) для обробки зерна: визначення ефективності та підбір оптимальної дози	10.11.25 – 21.11.25	
8	Розробка стартап проєкту	01.11.25 – 28.11.25	
9	Оформлення магістерської дисертації	28.11.25 – 10.12.25	
10	Перевірка на плагіат готової дисертації	15.12.2025	
11	Подання готової дисертації	15.12.2025	

Студентка _____
Науковий керівник _____

Юлія УДОВЕНКО
Ольга ОВЧАРЕНКО

РЕФЕРАТ

Магістерська дисертація: 125 с., 44 табл., 11 рис., 64 джерел, 5 додатків.

У контексті глобальної проблеми антибіотикорезистентності бактеріоцини, зокрема коліцини, розглядаються як перспективна альтернатива антибіотикам завдяки специфічній антибактеріальній дії проти патогенних штамів *E. coli* та відсутності розвитку резистентності. Одне з можливих практичних застосувань коліцинів стосується обробки кормів з метою профілактики ешерихіозів у сільськогосподарських тварин.

Роботу виконували в рамках теми «Біотехнологічні рослини для боротьби з інфекційними бактеріальними захворюваннями та фітодеструкції речовин- забруднювачів мілітарного походження» (№ 0125U000980) на базі Інституту клітинної біології та генетичної інженерії. Тому метою даної роботи є дослідження продукції коліцину у трансгенних рослинах *B. oleracea* L, spp. *acephala* DC, var *sabellica* L. (сорт «Кадет») з геном біосинтезу коліцину *cta*.

Завданнями дослідження було:

1. Провести літературний аналіз щодо експресії коліцину у різних рослинних системах;
2. Дослідити особливості спадкування гена коліцину М у T_1 та T_2 поколіннях трансгенних рослин;
3. Оцінити вплив умов культивування на активність коліцину М у рослин T_0 , T_1 та T_2 покоління;
4. Дослідити стабільність зберігання рослинних екстрактів, що містять коліцин М;
5. Оцінити вплив режиму висушування на активність коліцину М при тривалому та короткочасному зберіганні;
6. Змодельовати формулювання комбікорму з антимікробними властивостями проти *E. coli* за використання порошку висушеної листкової біомаси трансгенних рослин для обробки зерна.

Об'єкт дослідження: трансгенна капуста кале *B.oleracea* L, spp. *acephala* DC, var *sabellica* L. (сорт «Кадет»), що експресує рекомбінантний коліцин М. Предмет дослідження: антибактеріальна активність коліцину М. Предмет дослідження: продукція гетерологічного білка коліцину М та його антибактеріальна активність.

У роботі застосовані мікробіологічні, біохімічні та статистичні методи дослідження, а також метод культури *in vitro*.

Наукова новизна дослідження полягає у оцінці антибактеріальної активності коліцину М у капусті кале за різних умов культивування продуцента та зберігання біомаси, або екстрактів, що досліджується вперше в світі. Отримані результати є важливими для визначення споживчих характеристик рослинної біомаси, яка продукує коліцин М, а саме – умови зберігання, термін придатності, що необхідні для його комерційного впровадження у ветеринарну практику для обробки комбікормів з метою профілактики ешерихіозів серед сільськогосподарських тварин.

Результати підтвердили антимікробну активність коліцину М як у T_0 трансгенній капусті кале, так і T_1 та T_2 поколіннях. Було підтверджено, що ген коліцину М спадкується та експресується у T_1 та T_2 поколіннях. Антибактеріальна активність екстрактів з коліцином М залежить від умов культивування рослин: активність екстрактів вища щонайменше у 8-32 рази при виділенні з трансгенних рослин, які культивували в тепличних умовах, порівняно з вирощеними в умовах *in vitro*. У водних неочищених екстрактах активність коліцину М за температури 2-8 °С зберігалася щонайменше 5 днів. Висушування біомаси за кімнатної температури дозволяє зберегти високу активність екстрактів з коліцином М. Показано захисний антимікробний ефект при обробці зерна порошком біомаси з трансгенної капусти при використанні 1-10 % порошка. Розробка стартап проекту дозволила визначити конкурентну ціну розробленого продукту, що складає 850 грн/кг. З плановим виробництвом у 26 000 кг продукту на рік період капіталовкладень у проєкт становить 0,99 роки, а його рентабельність – 114,19 % на рік.

Результати роботи були опубліковані у тезах конференції XIX Міжнародної науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття», V конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія», а також на II Міжнародній науково-практичній конференції «Інноваційні матеріали та технології: біотехнологія, прикладна хімія, екологія». Також запланована публікація оглядової статті в журналі «Біологічні системи: теорія та інновації», яка нині знаходиться на стадії рецензування.

МОЛЕКУЛЯРНИЙ ФАРМІНГ, ТЕРАПЕВТИЧНІ БІЛКИ, BRASSICA OLERACEA, КОЛІЦИНИ, БАКТЕРІОЦИНИ,

ABSTRACT

Master's thesis: 125 pages, 44 tables, 11 figures, 64 sources, 5 attachments.

In the context of the global problem of antibiotic resistance, bacteriocins, in particular colicins, are considered a promising alternative to antibiotics due to their specific antibacterial action against pathogenic strains of *E. coli* and the absence of resistance development. One of the possible practical applications of colicins is in the treatment of feed for the prevention of escherichiosis in farm animals.

The work was carried out within the project «Biotechnological plants for combating infectious bacterial diseases and phytodestruction of military pollutants» (No. 0125U000980) at the Institute of Cell Biology and Genetic Engineering. Therefore, the aim of this work is to study colicin production in transgenic plants *B. oleracea* L, spp. *acephala* DC, var *sabellica* L. («Kadet» variety) with the colicin biosynthesis gene *cma*.

The research objectives were:

1. To conduct a literature review on colicin expression in various plant systems;
2. To investigate the inheritance patterns of the colicin M gene in the T1 and T2 generations of transgenic plants.
3. To evaluate the effect of cultivation conditions on colicin M activity in T0, T1, and T2 generation plants;
4. To investigate the storage stability of plant extracts containing colicin M;
5. To evaluate the effect of drying conditions on colicin M activity during long-term and short-term storage;
6. To simulate the formulation of feed additive with antimicrobial properties against *E. coli* using powdered dried leaf biomass from transgenic plants for grain treatment.

Object of study: transgenic kale cabbage *B. oleracea* L, spp. *acephala* DC, var *sabellica* L. («Kadet» variety), expressing recombinant colicin M. Subject of study:

antibacterial activity of colicin M. Subject of study: production of heterologous colicin M protein and its antibacterial activity.

The study used microbiological, biochemical, and statistical methods, as well as *in vitro* culture.

The scientific novelty of the study lies in the assessment of the antibacterial activity of colicin M in kale under various conditions of cultivation of the producer and storage of biomass or extracts, which is being studied for the first time in the world. The results obtained are important for determining the consumer characteristics of plant biomass that produces colicin M (e.g., the storage conditions and shelf life) necessary for its commercial introduction into veterinary practice for the treatment of compound feed for the prevention of escherichiosis among farm animals.

The results confirmed the antimicrobial activity of colicin M in both T_0 transgenic kale and T_1 and T_2 generations. It was confirmed that the colicin M gene is inherited and expressed in the T_1 and T_2 generations. The antibacterial activity of colicin M extracts depends on the conditions of plant cultivation: the activity of extracts is at least 8-32 times higher when isolated from transgenic plants cultivated in greenhouse compared to those grown *in vitro*. In unpurified aqueous extracts, the activity of colicin M at a temperature of 2-8 °C was maintained for at least 5 day. Drying the biomass at room temperature allows the high activity of colicin M extracts to be preserved. A protective antimicrobial effect has been demonstrated when treating grain with powdered biomass from transgenic cabbage using 1-10 % powder. The development of the start-up project made it possible to determine the competitive price of the developed product, which is 850 UAH/kg. With a planned production of 26,000 kg of product per year, the capital investment period for the project is 0.99 years, and its profitability is 114.19 % per year.

The results of the work were published in the abstracts of the XIX International Scientific and Practical Conference «Biotechnology of the XXI Century», the V Conference of Young Scientists «Plant Biology and Biotechnology», and the II International Scientific and Practical Conference

«Innovative Materials and Technologies: Biotechnology, Applied Chemistry, Ecology». A review article is also planned for publication in the journal «Biological Systems: Theory and Innovations», which is currently under review.

MOLECULAR FARMING, THERAPEUTIC PROTEINS, BRASSICA
OLERACEA, COLICINS, BACTERIOCINS

ЗМІСТ

ВСТУП	12
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	15
1.1 Рослинні системи експресії рекомбінантних терапевтичних білків	15
1.1.1 Біологічні особливості продуцента <i>B. oleracea</i>	17
1.1.2 Генетична трансформація <i>B. oleracea</i>	18
1.2 Характеристика коліцинів	20
1.2.1 Класифікація коліцинів.....	21
1.2.2 Структура та механізм дії коліцину М.....	23
1.2.3 Експресія коліцинів у рослинних системах.....	24
2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	27
2.1 Матеріали та методи досліджень	27
2.1.1 Методика культивування продуцента <i>B. oleracea</i>	27
2.1.2 Методика приготування рослинних екстрактів	28
2.1.3 Визначення кількості загальних розчинних білків у рослинах за методом Бредфорда.....	29
2.1.4 Методика визначення антибактеріальної активності коліцину М... 31	
2.1.5 Успадкування гена <i>ста</i> у поколіннях трансгенних рослин T ₁ та T ₂ 32	
2.1.6 Моделювання умов використання коліцину для створення комбікормів з антибактеріальною активністю проти <i>E. coli</i>	33
2.2 Результати та обговорення.....	34
2.2.1 Дослідження успадкування гену <i>ста</i> у трансгенних рослинах T ₁ та T ₂ поколінь	34
2.2.2 Вплив умов культивування на активність коліцину М з трансгенних рослин T ₀ , T ₁ та T ₂ поколінь	35
2.2.3 Дослідження стабільності коліцину М при зберіганні водних екстрактів трансгенної капусти, що експресує ген <i>ста</i>	44
2.2.4 Дослідження впливу висушування біомаси на активність коліцину М при довготривалому зберіганні	48
2.2.5 Перевірка антибактеріальної активності коліцину М при обробці зерна.....	57

3. РОЗРОБКА СТАРТАП ПРОЄКТУ	60
3.1 Резюме стартап проєкту	60
3.2 Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища стартапу	63
3.3 Визначення ключових факторів успіху проєкту	71
3.4 Визначення потенційних споживачів	74
3.5 Ціна інноваційної пропозиції на ринку	79
3.5.1 Визначення ціни на основі аналізу точки беззбитковості	80
3.5.2 Визначення ціни витратним методом	81
3.5.3 Визначення ціни агрегатним методом	82
3.5.4 Визначення ціни параметричним методом.....	82
3.5.5 Визначення ціни конкурентним методом.....	83
3.5.6 Техніко-економічні показники стартапу	84
3.6 Концепція бізнес-моделі проєкту та карта бізнес-процесів реалізації проєкту	95
3.7 Ризики стартап проєкту та методи управління ними.....	98
ВИСНОВКИ.....	109
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	111
ДОДАТКИ.....	119

ВСТУП

Отримання терапевтичних білків у рослинах (молекулярний фармінг) є перспективним напрямком сучасної рослинної біотехнології. Експресія рекомбінантних білків у рослинних системах, на відміну від бактеріальних та тваринних, дозволяє отримувати цільовий білок у функціонально активній формі, а також уникнути ризику контамінації патогенами тваринного походження, бактеріальними ендотоксинами [1].

Зважаючи на глобальну проблему антибіотикорезистентності, серед різноманіття терапевтичних білків, особливу увагу привертають бактеріоцини – білки з антибактеріальною активністю, які розглядаються як перспективна альтернатива антибіотикам. Одними з важливих для практичного використання бактеріоцинів є коліцини – білки з широким спектром антибактеріальної активності проти патогенних штамів *Escherichia coli*, до яких бактерії не набувають резистентності [2]. Оскільки ешерихіози передаються переважно через контаміновану їжу, коліцини розглядаються у якості ефективного засобу для обробки комбікормів, призначених для годівлі сільськогосподарських тварин.

На сьогодні повідомляється про успішну експресію коліцинів не тільки у тютюні [3, 4], а і у ряді їстівних рослин, таких як салат (*L. sativa*), капуста мізуна (*B. rapa*) [1], буряк (*Beta vulgaris*), шпинат (*Spinacia oleracea*) [4]. Рекомбінантні білки, зокрема, коліцин, отриманий з їстівних рослин, можна використовувати у вигляді неочищених екстрактів, висушеної біомаси, та інших формах, що не потребують високовартісної тонкої очистки, адже не містять токсичних речовин. Як наслідок, вартість кінцевого продукту може бути знижена щонайменше на 50 %, що зумовлює актуальність розробок у напрямку створення трансгенних їстівних рослин для експресії коліцинів [5].

Наразі продуктивність рослинних систем експресії коліцину сягає близько 2-3 мг білка/г сирої біомаси [3, 4]. Для збільшення виходу цільового білка в рамках теми «Біотехнологічні рослини для боротьби з інфекційними бактеріальними захворюваннями та фітодеструкції речовин-забруднювачів мілітарного походження» (№ 0125U000980) було запропоновано експресію коліцину у капусті кале (*B. oleracea* L. var. *acephala*), яка характеризується більшим вмістом білка порівняно з іншими культиварами *B. oleracea* [6]. Окрім високої продуктивності, капуста кале є оптимальним продуцентом з точки зору біобезпеки, адже є дворічною культурою, що знижує ризик горизонтального перенесення трансгена в екосистеми. Використання даного виду у якості продуцента коліцину М є новим, тому існує необхідність у визначенні виходу білка, дослідженні його антибактеріальної активності під дією різних факторів.

Метою даної роботи є дослідження продукції коліцину у трансгенних рослинах *B. oleracea* L, spp. *acephala* DC, var *sabellica* L. (сорт «Кадет») з геном біосинтезу коліцину *ста*. Завданнями дослідження було: провести літературний аналіз щодо експресії коліцину у різних рослинних системах; дослідити особливості спадкування гена коліцину М у T_1 та T_2 поколіннях трансгенних рослин; оцінити вплив умов культивування на активність коліцину М у рослин T_0 , T_1 та T_2 покоління; дослідити стабільність зберігання рослинних екстрактів, що містять коліцин М; оцінити вплив режиму висушування на активність коліцину М при тривалому та короткочасному зберіганні; змодельовати формулювання комбікорму з антимікробними властивостями проти *E. coli* за використання порошку висушеної листової біомаси трансгенних рослин для обробки зерна.

Об'єктом дослідження є трансгенна капуста кале *B. oleracea* L, spp. *acephala* DC, var *sabellica* L. (сорт «Кадет»), що експресує рекомбінантний коліцин М. Предметом дослідження є продукція гетерологічного білка коліцину М та його антибактеріальна активність.

Для визначення антибактеріальної активності коліцину готували рослинні екстракти на основі фосфатно-сольового буферу. Для кількісного визначення активності використано метод серійних розведень, а для якісної оцінки – модифікований диско-дифузійний метод з використанням висічок листя. Для визначення вмісту білка у отриманих рослинних екстрактах використовували метод Бредфорда. Для обробки даних, отриманих після спектрофотометричних вимірювань, використовували критерій Грабса. Для аналізу успадкування гена коліцину М, використовували критерій χ^2 .

Наукова новизна дослідження полягає у оцінці антибактеріальної активності коліцину М у капусті кале за різних умов культивування продуцента та зберігання біомаси, або екстрактів, що досліджується вперше в світі. Отримані результати є важливими для визначення таких споживчих характеристик рослинної біомаси, яку продукує коліцин М, як умови зберігання, термін придатності, що необхідні для його комерційного впровадження у ветеринарну практику для обробки комбікормів з метою профілактики ешерихіозів серед сільськогосподарських тварин.

Результати роботи були опубліковані у тезах конференції XIX Міжнародної науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття» (16 травня 2025 р.), V конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія» (15-16 травня 2025 р.), а також на II Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій 95-річчю Київського національного університету технологій та дизайну «Інноваційні матеріали та технології: біотехнологія, прикладна хімія, екологія» (30-31 жовтня 2025 р.). Також запланована публікація оглядової статті в журналі «Біологічні системи: теорія та інновації», яка нині знаходиться на стадії рецензування.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Рослинні системи експресії рекомбінантних терапевтичних білків

Терапевтичні білки – це білки, що використовують в рамках замісної терапії для лікування захворювань, пов'язаних з дисфункціями синтезу білків в організмі людини (наприклад, ферменти, гормони). Також до терапевтичних білків належать рекомбінантні антигени для формулювання субодиничних вакцин, антитіла, цитокіни, інтерферони, антимікробні білки, тощо [7]. Такі білки отримують як з використанням прокаріотичних (бактерії), так і еукаріотичних продуцентів (дріжджі, культури клітин комах чи ссавців, рослини та культури їх клітин *in vitro*).

Використання бактеріальних систем експресії дозволяє отримувати досить високий вихід цільового продукту за короткий проміжок часу з відносно невеликими витратами на виробниче культивування. Проте, суттєвими обмеженнями є відсутність у метаболізмі бактерій посттрансляційних модифікацій (ПТМ), які необхідні для активності білка *in vivo*, а також складність у отриманні гетерологічних білків з великою молекулярною масою. Перевагою еукаріотичних систем є наявність механізмів ПТМ, але водночас патерни цих модифікацій є різними (наприклад, у дріжджів), що може сприяти появі побічних реакцій при використанні даного терапевтичного засобу. Культури клітин ссавців або комах є оптимальними з точки зору експресії активних білків з коректним патерном ПТМ, проте у порівнянні з бактеріями та дріжджами вони мають нижчу продуктивність, через що вартість отриманого продукту є значно вищою. Для тваринних клітин додатковим обмеженням є ризик контамінації продукту патогенами, до яких чутливі ссавці, і контроль даного показника також впливає на кінцеву вартість продукту та рентабельність виробництва загалом [8].

У той же час рослини дозволяють отримати високий вихід біомаси з меншими витратами на культивування, синтезувати гетерологічні білки з великою молекулярною масою, а також уникнути ризику контамінації цільового продукту патогенами, до яких сприйнятливі ссавці [9]. Хоча терапевтичні засоби, отримані з рослин, ще не представлені на фармацевтичному ринку у великому обсязі через брак адаптованих до даної групи продуцентів регуляторних вимог, ряд продуктів все ж комерціалізовано. До них належить таліглюцераза альфа (Елелісо) з культури клітин моркви (*Daucus carota*), що застосовується для лікування хвороби Гоше (недостатність ферменту глюкоцереброзидази) [10].

Продуцентами, що утворюють велику кількість біомаси та легко піддаються генетичній трансформації є представники роду *Nicotiana*, а саме – *N. benthamiana*, *N. tabacum* [11, 12]. Також відносно легко отримують трансгенез у картоплі (*S. tuberosum*), яка утворює достатню кількість біомаси, і за рахунок високого вмісту крохмалю у бульбах, додатково забезпечує стабільність рекомбінантного білка при зберіганні [13]. Використання плодів томату (*S. lycopersicum*), які не потребують термічної обробки та очистки, у якості продуцента може дозволити отримувати їстівні терапевтичні засоби [14]. Разом з перерахованими перевагами, представники пасльонових часто синтезують в органах досить токсичні вторинні метаболіти (алкалоїди), що обмежує їхнє використання для виробництва їстівних терапевтичних засобів [15].

Експресія рекомбінантних білків у насінні злакових рослин (Poaceae), які характеризуються низьким вмістом вологи та зниженою активністю протеаз, дозволяє зберігати рекомбінантні білки тривалий час без втрати його кількості та активності [16], а рослинні продуценти, що належать до родини бобових (Fabaceae) є привабливими з точки зору високого вмісту рослинного білка. Однак, незважаючи на переваги, обидві групи рослин важко піддаються генетичній трансформації.

У той же час, використання їстівних рослин для експресії рекомбінантних білків пов'язане з ризиком потрапляння трансгена у природні екосистеми. Особливо високий ризик існує для рослин з перехресним запиленням. Горизонтального перенесення трансгену можна уникнути, використовуючи у якості продуцентів дворічні рослини – ті, що утворюють насіння на другий рік культивування та потребують яровизації. При зборі врожаю в перший рік існує цілковита безпека щодо несанкціонованого поширення трансгена з пилом. У даному аспекті перспективними продуцентами є різновиди капусти. Серед усіх представників родини Brassicaceae високу харчову цінність має вид *B. oleracea* var. *sabellica*. Окрім досить високого вмісту білка та здатності синтезувати велику кількість біомаси [17, 18], трансформація культиварів даного виду є більш ефективною, у порівнянні з іншими видами цієї родини [19], через що саме цей вид обрано у якості основного об'єкту досліджень.

1.1.1 Біологічні особливості продуцента *B. oleracea*

Рослини роду *Brassica* є економічно цінними сільськогосподарськими культурами, які культивують для вживання в їжу та отримання олії [20]. Найбільшого господарського значення як овочеві та фуражні культури набули культивари *B. oleracea*, серед яких розрізняють білокачанну капусту (var. *capitata*), листову капусту кале (var. *acephala*), брюсельську капусту (var. *gemmifera*), броколі (var. *italica*), кольрабі (var. *gongylodes*), цвітну капусту (var. *botrytis*), савойську капусту (var. *sabauda*) [21-24].

Представники *B. oleracea* є перспективними продуцентами терапевтичних білків, оскільки можуть синтезувати значну кількість біомаси з досить високим вмістом білка, та їх можна споживати в сирому вигляді (запобігання інактивації білка під дією температури) [20], мають високу харчову цінність [25-27], а також містять біологічно активні сполуки як глікозинолати, ізотіоціанати та флавоноїди [18, 26]. В той же час, через

складнощі при регенерації в умовах *in vitro* капуста належить до видів, які важко трансформувати. Цей етап є важливим у процесі створення трансгенних рослин [22, 28].

Обраний у якості основного об'єкту досліджень культивар *B. oleracea* var. *acephala* (капуста кале) містить більшу кількість білка (від 3 до майже 12 % свіжої біомаси та від 30 до майже 37 % сухої біомаси) [7] та біоактивних вторинних метаболітів (поліфеноли, глюкозинолати, флавоноїди), а також кращою стійкістю до дії несприятливих абіотичних факторів (низькі та високі температури) [21].

1.1.2 Генетична трансформація *B. oleracea*

Раніше повідомляли, що капуста може бути трансформована стабільно (з інтеграцією гена у геном рослини), а також транз'єнтно (без інтеграції гена у геном рослини) [29]. Серед способів стабільної трансформації розрізняють ядерну та хлоропластну трансформацію. Головна ідея стабільної трансформації полягає у тому, що у ядро або пластиди клітин, які активно діляться, переносять цільовий ген, а далі проводять селекцію та регенерацію рослин *in vitro*. Стабільну ядерну трансформацію найчастіше проводять шляхом інфікування експланту (меристеми, калюс, гіпокотиль, первинне листя, незрілі зародки) [30, 31] бактерією *Agrobacterium tumefaciens*. Ця методика заснована на тому, що *A. tumefaciens* містить Ті-плазмиду з Т-ДНК, що здатна інтегруватись у ядерний геном [29].

Стабільну хлоропластну трансформацію найчастіше проводять методом бомбардування мікрочастками – методом, при якому рекомбінантна ДНК наноситься на частинки золота, які під дією високого тиску у генних гарматах бомбардують експлант (міжвузля, калюс, адаксіальна сторона листя) [32], таким чином, цільовий ген вбудовується в пластомний геном шляхом гомологічної рекомбінації [33].

Крім того, для отримання трансгенних рослин можливе використання культури протопластів (культури клітин, позбавленої клітинної стінки), але тоді перенесення гетерологічної ДНК здійснюють з використанням поліетиленгліколю (ПЕГ) або електропорації [34]. Також повідомляли про досвід отримання культур бородатих коренів у броколі (*B. oleracea* var. *italica*) для синтезу глюकोзинолатів, а також у капусті кале (*B. oleracea* L, spp. *acephala* DC, var *sabellica* L.) [35] та цвітній капусті (*B. oleracea* var. *botrytis*) [36]. Для отримання культури бородатих коренів замість *A. tumefaciens* використовують вид *A. rhizogenes* [37].

Проте, стабільна трансформація капусти має низьку ефективність через складнощі у регенерації рослин в умовах *in vitro*, а саме неможливість утворення нових пагонів, химеризм, появу фенотипових змін. При чому ефективність регенерації дуже часто залежить від генотипу [38]. Попередні дослідження вказують, що частота регенерації декількох культиварів білокачанної капусти не перевищувала 3,3 % при хлоропластній трансформації [39]. Оптимізовані протоколи регенерації для білокачанної капусти можуть забезпечити ефективність регенерації у 92,5 %. У даному дослідженні трансформацію рослин проводили з використанням *A. tumefaciens* [40]. Для броколі (*B. oleracea* var. *italica*) та цвітної капусти (*B. oleracea* var. *botrytis*) частота регенерації іноді може перевищувати 80 % [28]. Для капусти кале повідомляли про ефективність регенерації, що складала близько 13 % [41]. Для кале була можлива методика транз'єнтної експресії у культурі протопластів, де частота трансфекції дорівнювала 76 % [42].

Проте, щодо *A. tumefaciens*-опосередкованої трансформації з використанням *B. oleracea* L, spp. *acephala* DC, var *sabellica* L., то станом на сьогодні існує досить мало наукових публікацій щодо створення стабільно трансформованих рослин. У тому числі відсутні публікації щодо експресії в капусті кале терапевтичних білків.

1.2 Характеристика коліцинів

Бактеріюцини – це білки, що їх виділяють деякі бактерії для пригнічення росту та розвитку споріднених штамів та видів. Подібне явище є одним з прикладів алелопатії і слугує для виживання бактерій у несприятливих умовах навколишнього середовища [43]. Важливо зазначити, що бактеріюцини відрізняються від антибіотиків як за структурними особливостями, так і за способом терапевтичного застосування. Бактеріюцини характеризуються більшою молекулярною масою і вузьким спектром дії. Через особливості антимікробної дії до бактеріюцинів рідко формується резистентність, через що мінімально ефективна доза чистої речовини є нижчою, у порівнянні з антибіотиками. Крім цього, бактеріюцини є перспективними кандидатами для лікування інфекцій, спричинених мультирезистентними до антибіотиків штамми бактерій. Проте, вузький спектр дії бактеріюцинів зумовлює необхідність їх застосування лише щодо ідентифікованих патогенів, на відміну від антибіотиків широкого спектра дії [44].

Бактеріюцини, що експресуються представниками родини Enterobacteriaceae (у тому числі в *E. coli*) називають коліцинами. Основними особливостями коліцинів є те, що вони мають відносно невелику молекулярну масу (до 80 кДа) та не зазнають посттрансляційних модифікацій [2, 45].

Раніше повідомляли, що коліцини експресуються не усіма бактеріальними штамми [46], що пов'язано з плазмідною локалізацією даної генетичної детермінанти (pCol) [45]. Експресія коліцинів не є конститутивною і індукується у відповідь на пошкодження ДНК та під дією несприятливих умов (збільшена популяція клітин, нестача поживних речовин). Внаслідок цього активується SOS-система, і активована протеїназа RecA розщеплює транскрипційний репресор оперону коліцину (білок LexA), дозволяючи його експресію [2, 45].

Загальний механізм дії коліцинів можна розділити на декілька етапів: експресія коліцину, вивільнення у зовнішньоклітинне середовище, прикріплення до мембранних рецепторів *E. coli* (наприклад, рецептори

захоплення вітаміну B_{12} , залізо-хелатних комплексів, сидерофорів) [43], транслокація коліцину всередину бактеріальної клітини через Tol або Ton системи та ініціація цитотоксичної дії [45].

1.2.1 Класифікація коліцинів

Основні підходи до класифікації коліцинів засновані на способі потрапляння у бактеріальну клітину, а також за механізмом антибактеріальної дії. В залежності від системи, через яку коліцин потрапляє до клітини, розрізняють коліцини групи А (транслюкуються через Tol систему) та групи В (транслюкуються через Ton систему). До коліцинів групи А відносять такі типи як А, E1-E9, K, L, N, S4, R, U, Y [47], а до коліцинів групи В – В, D, H, Ia, Ib, M, Z, 5 та 10 [45, 48]. Tol та Ton системи відіграють важливу роль у забезпеченні життєдіяльності бактеріальних клітин. Tol система необхідна бактеріальним клітинам для захоплення нутрієнтів (сидерофор з захопленим йоном заліза, вітамін B_{12} , вуглеводи), у той час як Ton система підтримує цілісність мембрани і бере активну участь у поділі клітин [49]. Коліцини груп А та В також відрізняються типом плазмід. Зазвичай коліцини групи А кодуються у плазмідах типу I (мають розмір ~ 10 кб, багатокопійні), а групи В – у плазмідах типу II (мають розмір ~ 40 кб, монокопійні в клітині, можуть передаватись під час кон'югації) [2, 43].

Основними мембранними рецепторами, до яких приєднуються коліцини групи А є BtuB (рецептор вітаміну B_{12}), Tsh (специфічний канал для деоксінуклеозидів), OmpW (транспорт L-карнітину), OmpA (структурна роль), IutA. Коліцини групи В взаємодіють з рецепторами Tsh, Cir (коліцин I рецептор), FerA (транспорт ентеробактина), FhuA (транспорт сидерофору феррихрому) [50]. Мутації у клітинних рецепторах є єдиним способом набуття резистентності бактерій до коліцинів, проте коліцини можуть потрапляти всередину клітини під дією стресорних умов. Важливо також зазначити, що незважаючи на конкуренцію природних лігандів та коліцинів, при зв'язуванні з останніми формується більш стійкий комплекс, тому додавання нативного

ліганду в середовище для розпаду утвореного комплексу вже не є ефективним [43].

В залежності від механізму антибактеріальної дії розрізняють коліцини з нуклеазною (проти ДНК, рРНК, тРНК), пороформуючою активністю, а також коліцини, що інгібують синтез пептидогліканів [45].

Коліцини з нуклеазною активністю спричиняють руйнування фосфодіефірного ланцюгу рРНК (E3, E4, E6), тРНК (D, E5) або ДНК (E2, E7, E8, E9) і для їхньої активності необхідна наявність йонів Zn^{2+} , Ni^{2+} у реакційному середовищі [2, 43]. Пороформуючі коліцини утворюють іон-проникні канали у внутрішній мембрані, що призводить до деполяризації клітини. До пороформуючих коліцинів належать коліцини типу N, K, 5, U, B, Ia, Ib, R [5, 43, 47]. Пороформуючі коліцини є одними з найбільш ефективних, адже у попередніх дослідженнях повідомлялось, що для лізису бактеріальної клітини достатньо лише однієї молекули [2]. Третій різновид коліцинів – це коліцини, що порушують полімеризацію пептидогліканів, основного компоненту клітинної стінки бактерій. До інгібіторів полімеризації пептидогліканів належать коліцини M [44] та Z [48].

Окрім коліцину Js [48], всі типи коліцинів складаються з трьох доменів: N-кінцевий, центральний та C-кінцевий. N-кінцевий домен взаємодіє з транслокаційною системою (Tol, Ton), центральний домен взаємодіє з рецептором (найбільший домен, що складає 50 % білка), а C-кінцевий домен виконує цитотоксичну роль [43, 45].

Крім цього, коліцини всіх типів мають подібну молекулярно-генетичну організацію. Плазмідна рCol має структурний ген коліцину (*sca*, для плазмід типу II можлива присутність декількох структурних генів), ген імунного білка (*sxi*) та ген лізису (*sxl*, відсутній у коліцинах групи B, крім коліцинів 5, 10 та D). Імунний білок нейтралізує цитотоксичний C-кінцевий домен і захищає клітину-господаря від дії коліцинів. Для пороформуючих коліцинів імунний білок розташовується між структурним геном та геном лізису і конститутивно транскрибується. Для коліцинів з нуклеазною активністю такий ген має

власний конститутивний промотор. Ген лізису спричиняє загибель бактерії, що продукувала коліцин, таким чином вивільнюючи його у зовнішньоклітинне середовище [2, 43, 50].

Описані коліцини проявляють антибактеріальну активність проти широкого спектра груп *E. coli*: AIEC – адгезивно-інвазивних (E1, E3, E9, D), EIEC – ентероінвазивних (коліцин Z, Js), EPEC – типових та атипівних ентеропатогенних (коліцин E2, E3, E8), EAEC – ентероагрегативних (коліцин E2, E3, E8, R), ETEC – ентеротоксигенних та EHEC – ентерогеморагічних (коліцин E2, E3, E8), а також для штамів *Shigella* spp. (коліцин Z) [43, 48].

Крім антибактеріальної активності повідомлялось, що коліцини проявляли специфічну цитотоксичність проти ліній клітин раку грудей, раку кишківника, ряду сарком, отже можуть мати терапевтичний потенціал у лікуванні злоякісних пухлин [2].

1.2.2 Структура та механізм дії коліцину М

Коліцин М складається з 271 амінокислотних залишків і має молекулярну масу 29 кДа. У N-кінцевому домені має TonB бокс, через який білок взаємодіє з транслокаційною системою TonB/ExbB/ExbD [45].

Центральний домен коліцину М зв'язується з білком FhuA, що розташований на зовнішній мембрані бактеріальної клітини та відповідальний за поглинання феррихрому. Далі через N-кінцевий домен відбувається транслокація коліцину М до периплазматичного простору. Альтернативно білок може потрапляти до периплазматичного простору внаслідок осмотичного шоку, через Sec-систему (при додаванні до N-кінця сигнальної послідовності OmpA). Гіпотетично, коліцин потрапляє до периплазматичного простору у розгорнутому стані.

Штами, що резистентні до коліцину М мають мутації у генах *fhuA*, *tonB*, *exbB/exbD*, таким чином білок не може потрапити всередину клітини. Але якщо коліцин потрапляє до периплазми внаслідок осмотичного шоку,

омінаючи транслокаційну систему, тоді він зможе спричинити лізис навіть резистентних штамів [45].

Для активності коліцину всередині клітини необхідна експресія генів *tolM* та *fkpA*, продукти яких спричиняють згортання периплазматичних білків. Припускається, що від експресії останнього залежить активність коліцину М в клітині, і саме він бере участь у процесі дозрівання білка.

В основі антибактеріальної дії коліцину М лежить порушення полімеризації пептидоглікану, який є основою бактеріальної клітинної стінки [45]. Для проявлення антибактеріальної активності коліцин М потребує наявності йонів Mg^{2+} у реакційному середовищі. Синтез пептидогліканів складається з основних етапів: синтез нуклеотид-активованих цукрів та амінокислот в цитоплазмі, збірка цукрів з амінокислотами у комплекс (UDP-MurNac-пентапептид або нуклеотид Парка) та приєднання до ліпідного транспортера C55P на цитоплазматичній поверхні ІМ (утворення ліпиду-I, який далі перетворюється на ліпід-II внаслідок додаткового приєднання GlcNac), перенесення ліпиду-II до периплазми фліпазою, полімеризація гліканових мономерів у гліканові нитки з подальшим утворенням крос-зв'язків [51]. Саме коліцин гідролізує фосфодіефірний зв'язок ліпиду-II (хоча здатен діяти і на ліпід-I). Ліпід-II внаслідок гідролізу розпадається на 1-PP-MurNac(-пентапептид)-GlcNac [45]. Коліцин М серед усіх типів коліцинів має найширшу антибактеріальну активність проти ентерогеморагічних штамів *E. coli*, а також проти *Klebsiella pneumoniae* [1].

Створення химерного білка коліцину М може додатково збільшити спектр його активності, хоча це не є оптимальною стратегією з точки зору регуляторних вимог [45].

1.2.3 Експресія коліцинів у рослинних системах

Наразі є повідомлення про експресію коліцинів у рослинах з різних філогенетичних груп. В усіх дослідженнях для трансформації було використано *A. tumefaciens* для перенесення гена та його інтеграції у ядерний

геном або для транз'єнтної експресії. Проте, все ж протоколи не є ідентичними, а оптимізовані саме під вид рослин, що використовується для трансформації.

У дослідженні, проведеному С. Шульцем та ін. (2015) у 6-тижневому тютюні (*N. benthamiana*), 5-тижневому шпинаті (*S. oleracea*) та 4-тижневому дикуму буряку (*B. vulgaris*) було використано систему magnICON® (вектор на основі деконструйованого вірусу тютюнової мозаїки) для транз'єнтної експресії коліцинів (у тому числі коліцину М). Максимально граничний час експресії складав 10 днів після інфільтрації. Транз'єнтна експресія саме в тютюні дозволила порівняти ефективність різних типів коліцинів проти ряду ентерогеморагічних штамів *E. coli* (ЕНЕС). Найбільше накопичення у перерахунку на свіжу біомасу спостерігали для коліцину типу Е2 (2,07 мг/г), 5 (2,23 мг/г), Е6 (2,85 мг/г) та К (3,02 мг/г). Додатково було стабільно трансформовано 6-тижневий тютюн за наступною методикою: з листя готували диски, які ко-культивували з *A. tumefaciens*, що містила вектор pNMD18381 на основі вірусу тютюнової мозаїки з етанол-індуцибельним промотором, проводили регенерацію та селекцію трансформантів. Виявили, що експресія високих доз коліцинів з нуклеазною активністю проявляла токсичність для рослин, тому для збільшення виходу білка було використано стратегію ко-експресії коліцинів з відповідними імунними білками, експресованими з вектору на основі вірусу картоплі [5].

Для експресії коліцину М у тютюні (*N. tabacum*) також було використано методику листових дисків з подальшою ко-культивацією з *A. tumefaciens*, що містила вектор pCAMBIA 1305.1-colM, регенерацією та селекцією. У даному випадку максимальний рівень експресії досягав 2 мкг/г свіжої біомаси. Отриманий рекомбінантний коліцин М проявляв ефективну антибактеріальну активність щодо стандартних (*E. coli* ATCC 25,922, NCTC 8196, DH5- α , GM, NM) та клінічних ізолятів *E. coli*, *K. pneumoniae* [3].

Для трансформації салату (*L. sativa*) було використано 6-7 денні паростки, для трансформації капусти мізуни (*B. rapa* subsp. *nipposinica* var. *laciniata*) – 5-7 денні, які аналогічно ко-культивували з *A. tumefaciens*, що містила вектор pNMD46772 (ген коліцину М під контролем промотора CaMV 35S) [52]. Регенерований салат експресував до 16.81 мкг/г сирої біомаси, у той час як у мізуні вихід коліцину М сягав максимальної позначки у 13,61 мкг/г сирої біомаси. Антимікробна активність коліцину М була продемонстрована на ентерогеморагічних штамах *E. coli* (EHEC), а саме O157:H7, O104:H4, а також на резистентних до бета-лактамних антибіотиків та карбапенемів. Показано, що антибактеріальна активність коліцину при заморожуванні до – 80 °C та подальшому висушуванні біомаси зберігається протягом щонайменше 9 місяців [1].

Результати наведених досліджень свідчать про доцільність використання рослин як систем експресії коліцинів, зокрема завдяки досить високому виходу білка, його стабільності при зберіганні та достатній антибактеріальній активності. Водночас, перспективним напрямком досліджень є подальше вивчення можливостей експресії коліцину М у нових видах рослин, зокрема у капусті кале (*B. oleracea* L, spp. *acephala* DC, var *sabellica* L.). Такі дослідження необхідні для оцінки можливості експресії рекомбінантного білка у даному продуценті, вивченні трансгенераційної передачі гена *ста*, відповідального за біосинтез коліцину М та визначення його антимікробної активності щодо штамів *E. coli*.

2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2.1 Матеріали та методи досліджень

В роботі були використані трансгенні рослини *B. oleracea* L, spp. *acephala* DC, var *sabellica* L., що експресують ген *ста*, що відповідає за біосинтез коліцину М. Для трансформації рослин була використана генетична конструкція рNMD46772, що містить ген *ста* під контролем промотора CaMV 35S та селективний ген *bar*, що забезпечує стійкість трансформантів до глюфосинатів. Методика проведення стабільної трансформації описана в [1, 53]. Методика культивування та схрещування рослин для отримання покоління T₁ та T₂ описана в [54]. Насіння трансгенних рослин T₀-T₂ для дослідів було отримано з колекції Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України.

Визначення впливу умов культивування рослин (теплиця, *in vitro*), висушування біомаси на антибактеріальну активність коліцину, експресованого у рослині, а також для аналізу успадкування генетичної детермінанти коліцину гена *ста* проводили з трансгенними рослинами *B. oleracea* L, spp. *acephala* DC, var *sabellica* L. Що експресували ген *ста*.

2.1.1 Методика культивування продуцента *B. oleracea*

Для введення насіння трансгенних рослин T₁ та T₂ поколінь у культуру *in vitro* проводили його асептичну обробку. Методика стерилізації насіння складалась з наступних етапів: замочування насіння в 70 % етиловому спирті протягом 1 хвилини, замочування у комерційному розчині натрію гіпохлориту (білизна) протягом 5 хвилин, відмивання у дистильованій воді (двічі), замочування у стерильній дистильованій воді (двічі по 10 хвилин) [55].

Субкультивування рослин проводили за стандартними методиками з дотриманням правил асептики у ламінарному боксі. У якості живильного

середовища для росту рослин було використано середовище Мурасіге-Скуга відповідно до пропису, але з вдвічі зниженим вмістом макроелементів – $\frac{1}{2}$ середовища Мурасіге-Скуга ($\frac{1}{2}$ MS). Стандартний пропис середовища Мурасіге-Скуга наведений у [56].

Для селекції трансформантів у живильне середовище додавали глюфосинат амонію (активна речовина у складі гербіциду «Баста») у концентрації 15 мг/дм³. Культивування трансгенних рослин у культурі *in vitro* проводили у термальних кімнатах з освітленістю 2000 лк, фотоперіодом 16/8 годин та температурою 23-25 °С.

У культурі *in vitro* відібрали та культивували клони T₀ (T0-1), T₁ (T1-1iv, T1-2iv, T1-3iv, T1-4iv, T1-5iv) та T₂ (T2-1iv, T2-2iv) покоління трансгенних рослин.

Частину ліній рослин, що пройшли етап селекції на глюфозинаті амонію *in vitro* та підтвердили активність коліцину в тестах з антибактеріальної активності адаптували до умов *ex vitro*. Для цього рослини пересаджували в універсальний ґрунт для подальшого культивування у теплиці. Основні параметри культивування у теплиці були наступними: інтенсивність освітлення 5000-7000 лк, фотоперіод 16/8 годин, температура 23-25 °С.

У теплиці культивували клони T₀ (T0-1) та T₁ (T1-1, T1-2, T1-3, T1-4, T1-5) покоління трансгенних рослин.

2.1.2 Методика приготування рослинних екстрактів

Для проведення досліджень антибактеріальної активності та визначення вмісту білка використовували екстракти з листя трансгенних рослин. Екстракти з листя нетрансформованих рослин використовували у якості контролю.

Для приготування екстрактів на аналітичних вагах зважували 0,032 г сухої або 0,2 г свіжої біомаси, гомогенізували у порцеляновій ступці, поступово додаючи охолоджений однократний (1X) розчин фосфатно-

сольового буферу PBS об'ємом $1,0 \text{ см}^3$. Стандартний пропис буферу PBS наведений у [57].

Відділення осаду, що представляв собою залишки рослинних тканин, здійснювали центрифугуванням за температури 4°C та швидкості обертання ротора 13 000 об/хв протягом 10 хвилин. Надосадову рідину відбирали піпет-дозатором, а отримані екстракти зберігали у холодильнику за температури $2-8^\circ\text{C}$. Визначення антибактеріальної активності та вимірювання вмісту білка в зразках проводили в перші 24 години після приготування екстрактів.

2.1.3 Визначення кількості загальних розчинних білків у рослинах за методом Бредфорда

Для проведення аналізу були використані рослинні екстракти, що готували за методикою, описаною у п. 2.1.2. Визначення кількості розчинних білків у екстрактах здійснювали за методом Бредфорда у пласкодонному 96-лунковому планшеті [58].

Спочатку було приготовано реактив Бредфорда за прописом, наведеним у [59]. Для приготування розведень було використано буфер PBS. Для побудови калібровочної кривої було використано розчин бичачого сироваткового альбуміну (БСА) у вихідній концентрації 1 мг/см^3 . Спершу у лунках планшету з використанням буферу PBS були приготовані розведення БСА у таких концентраціях: 1 мкг/100 мм^3 ($1 \text{ мм}^3 \text{ БСА} + 99 \text{ мм}^3 \text{ PBS}$), 2 мкг/100 мм^3 ($2 \text{ мм}^3 \text{ БСА} + 98 \text{ мм}^3 \text{ PBS}$), 4 мкг/100 мм^3 ($4 \text{ мм}^3 \text{ БСА} + 96 \text{ мм}^3 \text{ PBS}$), 8 мкг/100 мм^3 ($8 \text{ мм}^3 \text{ БСА} + 92 \text{ мм}^3 \text{ PBS}$), 12 мкг/100 мм^3 ($12 \text{ мм}^3 \text{ БСА} + 88 \text{ мм}^3 \text{ PBS}$), 16 мкг/100 мм^3 ($16 \text{ мм}^3 \text{ БСА} + 84 \text{ мм}^3 \text{ PBS}$), 20 мкг/100 мм^3 ($20 \text{ мм}^3 \text{ БСА} + 80 \text{ мм}^3 \text{ PBS}$). Кожне розведення БСА було виконано у трьох повторях (лунках).

Екстракти з нетрансгенних рослин (негативний контроль) та трансгенних рослин (дослідні проби) розводили у відношенні 2 мм^3 екстракту та 98 мм^3 буферу PBS у кожен лунку. Розведення кожної проби повторювали

щонайменше у трьох повторях (лунках). Подальші етапи аналізу були проведені згідно протоколу [58].

Отримані дані аналізували за критерієм Грабса для виключення грубих похибок у вимірюваннях. За нульову гіпотезу (H_0) приймаємо, що підозріле значення належить до генеральної сукупності; за альтернативну (H_A) – підозріле значення не належить до генеральної сукупності.

Нульова гіпотеза підтверджується, якщо розраховане значення β менше за табличне. Розрахунок β проводився за формулою 2.1:

$$\beta = \frac{|x_{\max(\min)} - \bar{x}|}{S}, \quad (2.1)$$

де $x_{\max(\min)}$ – найбільший або найменший результат вимірювань, $\bar{x}$ – середнє арифметичне вибірки, S – стандартне відхилення.

Після визначення значення β його порівнюють з табличним ($\beta_{\text{табл}}$, обирається в залежності від розміру вибірки при $\alpha=0,05$). Ступінь належності підозрілого значення генеральній сукупності (ε) визначається за формулою 2.2:

$$\varepsilon = \frac{\beta_{\text{табл}}}{\beta}, \quad (2.2)$$

де $\beta_{\text{табл}}$ – табличне значення β .

Якщо $\varepsilon > 1$, то підозрюване значення належить генеральній сукупності (H_0), у іншому випадку – не належить до генеральної сукупності (H_A) і має бути вилучене з вибірки. Після вилучення з вибірки грубих похибок, калькуляцію повторюють, розраховуючи нові значення $\bar{x}$ та S та β , відповідно. Розрахунок проводився з використанням надбудови «Аналіз даних» MS Excel.

2.1.4 Методика визначення антибактеріальної активності коліцину М

Для визначення антибактеріальної активності коліцину, синтезованого в рослинах, використовували чутливі лабораторні штами *Escherichia coli* DH 5 α та XL blue-1. Штам XL blue-1 має стійкість до тетрацикліну, що дозволяє працювати з екстрактами, або порошками з біомаси без потреби в їхній стерилізації, оскільки додавання тетрацикліну, інгібує ріст широкого спектру неспецифічної мікрофлори, але не самого штаму. Первинна оцінка активності коліцину М проводилась модифікованим диск-дифузійним методом на живильному середовищі LB (Luria-Bertani) з додаванням 10 мг/дм³ тетрацикліну та тест-культури *E. coli* XL1-Blue. Пропис середовища LB наведений у [60]. При використанні штама *E. coli* DH 5 α необхідною умовою для коректності досліду була стерилізація екстрактів фільтруванням. В середовище для культивування тетрациклін, в цьому випадку, не вносили. Процедура визначення антибактеріальної активності субстратів проводили за методикою, описаній в [1].

Для попередньої оцінки антибактеріальної активності за допомогою пробійника готували висічки з листя рослин діаметром 5 мм, які поміщали на поверхню агаризованого середовища LB з ресуспендованою в ньому тест-культурою. Порівняльну оцінку активності коліцину М проводили за діаметром зон лізису [61]. У якості негативного контролю використовували висічки листя нетрансформованих рослин, а у якості позитивного – висічки з листя трансгенної капусти мізуни (*B. rapa*), в якій раніше було підтверджено наявність вставки гена *ста* та методом вестерн блотингу присутність коліцину М [1]. Результати цих досліджень були також використані для вивчення особливостей спадкування гена *ста* у трансгенних рослинах наступних поколінь (див. п. 2.1.5).

Поглиблені дослідження антибактеріальної активності коліцину М, що містився у екстрактах, проводили шляхом приготування серійних двократних розведень у двох повторах на живильному агаризованому середовищі LB з

інокульованою тест-культурою бактерій *E. coli* XL1-Blue. Для розведення екстрактів було використано розчин 1X PBS, на якому, власне, їх і готували (див. п. 2.1.2). Усі розведення наносили на поверхню середовища в об'ємі 5 мм³. У якості негативних контролів у одну з секцій вносили розчин 1X PBS, а також екстракт, виділений з нетрансформованої рослини.

Кількісне визначення активності коліцину М встановлювали шляхом визначення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) – найбільшого розведення екстракту, що викликає лізис бактерій.

Для розрахунку активності коліцину М у АУ/см³ максимальне розведення, що дає зону лізису, множили на 200. Для перерахунку активності коліцину на 1 г сирої (сир.) або сухої (сух.) маси максимальне розведення множили на 240, ділили на масу використаної для приготування екстракту наважки рослинного матеріалу та множили на 1 г [1,4]. Для проб, в яких визначали вміст білка, було проведено нормалізацію активності коліцину М на вміст білка, отримуючи значення АУ/г загального розчинного білка (ЗРБ).

Також вимірювали діаметр зон лізису. Середнє значення діаметра зон лізису для кожного розведення було отримано шляхом усереднення результатів двох повторів та визначення стандартного відхилення. Розрахунок проводили з використанням програми MS Excel.

2.1.5 Успадкування гена *ста* у поколіннях трансгенних рослин T₁ та T₂

Для визначення особливостей успадкування гена коліцину М насіння рослин T₁ покоління стерилізували, вводили в умови *in vitro* та культивували на селективному середовищі за методикою, описаною в п. 2.1.1. Після завершення селекції було підраховано кількість живих з активним ростом і коренеутворенням (мають ген стійкості) та загиблих (не мають гена стійкості) рослин.

При дослідженні особливостей спадкування гена коліцину М у T₁ та T₂ поколіннях трансгенних рослин для порівняння відповідності емпіричного

розподілу категоріальних даних теоретичному розподілу було використано критерій Пірсона (χ^2 -тест). Нульова гіпотеза (H_0): розщеплення за фенотипом (стійкість до глюфосинату амонію) складає 1:1 (аналізуюче схрещування з рослиною дикого фенотипу по батьківській лінії), що свідчить про одну вставку гена. Альтернативна гіпотеза (H_1): розщеплення гену за фенотипом (стійкість до глюфосинату амонію) не дорівнює 1:1, що свідчить про більшу кількість копій гена. Розрахунок значення χ^2 проводили за формулою 2.3:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}, \quad (2.3)$$

де O – емпіричне значення (observed), E – очікуване значення (expected).

Після розрахунку значення χ^2 визначають кількість рівнів свободи (df) та для довірчого інтервалу (α) 0,05 знаходять критичне значення. Якщо розраховане χ^2 менше за критичне, то приймається нульова гіпотеза.

2.1.6 Моделювання умов використання коліцину для створення комбікормів з антибактеріальною активністю проти *E. coli*

Для перевірки захисного антибактеріального впливу сушеної біомаси капусти, що продукує коліцин M, при обробці зерна, наважки пшеничної крупи були простерилізовані автоклавуванням у скляному посуді. Вага кожного зразка складала 5 г. Висушене листя трансгенних рослин T_0 покоління та нетрансгенних рослин було подрібнене механічно в ступці до досягнення порошкоподібного стану. Сушене листя не автоклавували, щоб не інактивувати коліцин.

У кожен зразок було додано по 200 мм³ рослинної олії. Один зі зразків лишили тільки з олією (негативний контроль), у один додали подрібнений порошок нетрансгенних рослин 1 та 10 % (50 мг та 500 мг, негативні контролю), у інші – подрібнений порошок трансгенних рослин різної ваги 0,1 %, 1 %, або 10 % (відповідно, 5 мг, 50 мг, 500 мг на 5 г наважки). Після ретельного

перемішування порошку з зерном, окремі зерна викладали на засіяну газоном бактерій *E. coli* XL1-Blue поверхню агаризованого середовища LB, описаного у п. 2.1.4.

Через 18 годин проводили облік результатів, а саме – визначали кількість зерен, навколо яких спостерігали добре помітні неозброєним оком зони лізису бактерій, та здійснювали підрахунок їхнього співвідношення до загальної кількості оброблених зерен.

2.2 Результати та обговорення

2.2.1 Дослідження успадкування гену *ста* у трансгенних рослинах T₁ та T₂ поколінь

Для дослідження особливостей успадкування та експресії гена коліцину М (*ста*) у нащадках першого та другого покоління насіння (n=24) стерилізували за методикою, описаною в п. 2.1.1. Асептичне насіння культивували у чашках Петрі з живильним середовищем ½ MS протягом 7 днів. Схожість насіння складала 96 %, ознак наявності контамінації ендогенними мікроорганізмами не було виявлено.

Подальше культивування здійснювали на селективному середовищі, описаному в п. 2.1.1. Тривалість селекції склала 39 днів, після чого було проведено облік живих (мають ген стійкості до гербіциду) та загиблих рослин (не мають гена стійкості). Ці дані дозволили визначити співвідношення трансформованих до нетрансформованих рослин. Результати спостережень наведені у табл. 2.1.

Таблиця 2.1 – Результат проведення селекції рослин T₁ покоління

№ чашки	Всього рослин	Кількість стійких рослин	Кількість не стійких рослин
1	2	3	4
1	3	1	2
2	3	0	3
3	3	2	1
4	3	1	2

Продовження таблиці 2.1

1	2	3	4
5	3	0	3
6	3	1	2
7	2	1	1
8	2	2	0
9	1	1	0
10	1	0	1
<i>Всього:</i>	<i>24</i>	<i>9</i>	<i>15</i>

Емпіричні дані (О) свідчать про те, що серед 24 рослин 9 мають вставку гена і виживають на селективному середовищі, а 15 – не мають гена стійкості і гинуть в наслідок дії гербіциду. Оскільки для гібридів T_1 покоління проводили аналізуюче схрещування, приймаємо, що при теоретичному розподілі (Е) з 24 рослин ген стійкості матимуть 12 рослин, а інші 12 рослин – фенотип дикого типу. Розрахунок проводили за формулою 2.3:

$$\chi^2 = \frac{(9 - 12)^2}{12} + \frac{(15 - 12)^2}{12} = 1,5 \quad (2.3)$$

При наявності двох класів рівень свободи (df) дорівнює 1. При довірчому інтервалі (α) 0,05 критичне значення дорівнює 3,841. Оскільки розраховане значення χ^2 є меншим за критичне, приймаємо нульову гіпотезу: рослини T_1 покоління мають розщеплення фенотипу (стійкість до глюфосинату амонію) 1:1, що свідчить про одну вставку гена. T_2 покоління рослин отримували при схрещуванні гетерозиготних рослин T_1 між собою, в результаті чого отримували розщеплення 3:1 (не стійка, що підтвердило очікувану гіпотезу [54].

2.2.2 Вплив умов культивування на активність коліцину М з трансгенних рослин T_0 , T_1 та T_2 поколінь

Екстракти з трансгенних рослин: первинного трансформанту, першого та другого покоління рослин *B. oleracea* L spp. *acephala* DC var. *sabellica* L.,

культивовані у теплиці та у культурі *in vitro*, були використані для визначення антибактеріальної активності коліцину М. Двократні розведення екстрактів були приготовані за методикою, описаною в п. 2.1.4.

На рисунку 2.1 зображено результат титрування екстрактів трансгенної капусти для визначення антибактеріальної активності коліцину М, отриманих з рослин T₀ покоління, проти штаму *E. coli* XL1-Blue:

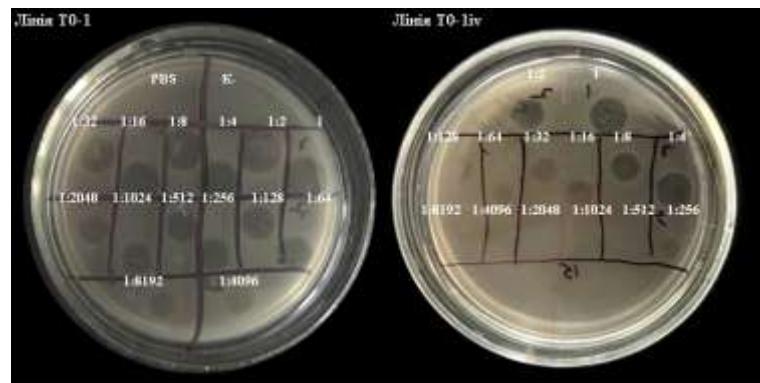


Рисунок 2.1 – Визначення антибактеріальної активності коліцину М в екстрактах, виділених з листків трансгенних ліній капусти T₀ покоління, що експресують ген коліцина *ста*

З рис. 2.1 видно, що край зони лізису чіткий для усіх розведень, а також спостерігається лінійне зменшення діаметру зі збільшенням розведення. Екстракти, приготовані з тепличних рослин, візуально мають більші діаметри зон лізису, що свідчить про вищу антибактеріальну активність екстрактів. Результати визначення діаметру зон лізису та мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) наведені у табл. 2.2:

Таблиця 2.2 – Визначення МІК екстрактів, виділених з трансгенних рослин T₀ покоління, що містять коліцин М

	Лінія T0-1	Лінія T0-1iv
Розведення	d _{зон лізису} , см	
1	2	3
Вихідний екстракт	1,40 ± 0,14	1,20 ± 0,00

Продовження таблиці 2.2

1	2	3
1:2	$1,35 \pm 0,07$	$1,05 \pm 0,07$
1:4	$1,23 \pm 0,06$	$1,00 \pm 0,14$
1:8	$1,23 \pm 0,06$	$0,90 \pm 0,14$
1:16	$1,17 \pm 0,12$	$0,75 \pm 0,07$
1:32	$1,07 \pm 0,06$	$0,65 \pm 0,07$
1:64	$1,00 \pm 0,00$	$0,55 \pm 0,21$
1:128	$0,97 \pm 0,06$	$0,45 \pm 0,21$
1:256	$0,90 \pm 0,00$	$0,35 \pm 0,21$
1:512	$0,83 \pm 0,06$	-
1:1024	$0,77 \pm 0,12$	-
1:2048	$0,53 \pm 0,25$	-
1:4096	$0,55 \pm 0,21$	-
1:8192	$0,55 \pm 0,21$	-
Антибактеріальна активність екстракту, AU/см³	1 638 400	51 200

Спостерігається, що у екстрактах рослин, які були вирощені в культурі *in vitro* активність коліцину М у 32 рази нижча ($51\,200\text{ AU/см}^3$), ніж активність коліцину М, що експресується у трансгенних рослинах Т₀ в умовах у теплиці ($1\,638\,400\text{ AU/см}^3$). Такі відмінності пов'язані з тим, що рослини, які були вирощені в теплиці, отримували кращу освітленість (що сприяло повноцінному фотосинтезу), цілком автотрофному способу живлення та кращому біосинтезі білків, в т.ч. гетерологічних.

Результат визначення антибактеріальної активності коліцину М в екстрактах, отриманих з рослин Т₁ покоління, наведено у додатку А. Для екстрактів з рослин Т₁ покоління також спостерігали чіткий край зон лізису. Зонам інгібування росту бактерій також характерне було лінійне зменшення діаметру зі збільшенням розведення. Результати вимірювання діаметрів зон лізису та МІК наведені у табл. 2.3:

Таблиця 2.3 – Визначення МІК екстрактів, виділених з трансгенних рослин T₁ покоління, що містять коліцин М

	T1-1	T1-1iv	T1-2	T1-2iv	T1-3	T1-3iv	T1-4	T1-4iv	T1-5	T1-5iv
Розведення	d _{зон лізису} , см									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Вихідний екстракт	1,30 ± 0,00	1,15 ± 0,21	1,05 ± 0,07	1,20 ± 0,00	1,20 ± 0,00	1,15 ± 0,07	1,20 ± 0,00	1,30 ± 0,00	1,00 ± 0,14	1,20 ± 0,14
1:2	1,30 ± 0,00	1,15 ± 0,21	0,95 ± 0,07	1,10 ± 0,14	1,15 ± 0,07	1,00 ± 0,00	1,10 ± 0,00	1,10 ± 0,00	0,95 ± 0,21	1,15 ± 0,07
1:4	1,20 ± 0,00	0,90 ± 0,14	0,95 ± 0,07	1,05 ± 0,07	1,05 ± 0,07	1,00 ± 0,00	1,05 ± 0,07	1,05 ± 0,07	0,80 ± 0,14	1,05 ± 0,07
1:8	1,20 ± 0,14	0,80 ± 0,14	0,85 ± 0,07	0,95 ± 0,07	1,05 ± 0,07	0,95 ± 0,07	1,00 ± 0,00	0,95 ± 0,07	0,75 ± 0,21	1,00 ± 0,00
1:16	1,15 ± 0,07	0,70 ± 0,14	0,75 ± 0,07	0,80 ± 0,00	0,95 ± 0,07	0,75 ± 0,07	0,95 ± 0,07	0,85 ± 0,07	0,75 ± 0,21	0,95 ± 0,07
1:32	1,10 ± 0,00	0,65 ± 0,21	0,60 ± 0,14	0,80 ± 0,00	0,90 ± 0,14	0,70 ± 0,14	0,85 ± 0,07	0,70 ± 0,14	0,50 ± 0,14	0,85 ± 0,07
1:64	1,00 ± 0,00	0,50 ± 0,00	0,65 ± 0,21	0,70 ± 0,00	0,90 ± 0,14	0,50 ± 0,00	0,80 ± 0,00	0,50 ± 0,14	0,40 ± 0,00	0,65 ± 0,21
1:128	1,00 ± 0,00	0,45 ± 0,07	0,55 ± 0,21	0,70 ± 0,00	0,80 ± 0,14	0,35 ± 0,07	0,80 ± 0,00	-	0,40 ± 0,00	0,55 ± 0,21
1:256	0,95 ± 0,07	0,25 ± 0,07	0,50 ± 0,00	0,50 ± 0,00	0,80 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,55 ± 0,07	-	-	-
1:512	0,95 ± 0,07	-	0,40 ± 0,00	-	0,65 ± 0,07	-	0,50 ± 0,14	-	-	-
1:1024	0,85 ± 0,07	-	0,3 ± 0,07	-	0,50 ± 0,00	-	0,50 ± 0,00	-	-	-
1:2048	0,75 ± 0,07	-	0,3 ± 0,00	-	0,35 ± 0,07	-	0,50 ± 0,00	-	-	-
1:4096	0,60 ± 0,28	-	-	-	0,20 ± 0,00	-	-	-	-	-

Продовження таблиці 2.3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1:8192	0,55 ± 0,35	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1: 16384	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Антибактеріальна активність екстракту, AU/см³	1 638 400	51 200	409 600	51 200	819 200	51 200	409 600	12 800	25 600	25 600

Аналогічно до екстрактів з рослин T₀ покоління, активність коліцину М в екстрактах T₁ покоління у культурі *in vitro* була у 8-32 разів нижча (12 800-51 200 AU/см³), аніж активність коліцину М у трансгенних рослинах T₁, що культивували в теплиці (104 200-1 638 400 AU/см³). Виключення становить лінія T1-5, в якій активність коліцину М була однаковою як при умові культивування *in vitro*, так і в теплиці.

На рисунку 2.2 зображено результат визначення антибактеріальної активності коліцину М, в екстрактах, отриманих з T₂ покоління рослин:



Рисунок 2.2 – Визначення активності коліцину М в екстрактах, виділених з листків трансгенних ліній капусти T₂ покоління, що експресують ген коліцину *ста*

З рис. 2.2 видно, що край зони лізису чіткий для усіх розведень, а також спостерігається лінійне зменшення діаметру зі збільшенням розведення. Результати вимірювання діаметрів зон лізису та МІК наведені у табл. 2.4:

Таблиця 2.4 – Визначення МІК екстрактів, виділених з трансгенних рослин T₂ покоління, що містять коліцин М

	Лінія T2-1iv	Лінія T2-2iv
Розведення	d _{зон лізису} , см	
1	2	3
Вихідний екстракт	1,00 ± 0,00	0,90 ± 0,14
1:2	0,95 ± 0,07	0,75 ± 0,21
1:4	0,90 ± 0,00	0,65 ± 0,21
1:8	0,75 ± 0,07	0,60 ± 0,28
1:16	0,80 ± 0,00	0,80 ± 0,00
1:32	0,70 ± 0,00	0,50 ± 0,00
1:64	0,70 ± 0,00	0,30 ± 0,00
1:128	0,50 ± 0,00	-
1:256	-	-
1:512	-	-
1:1024	-	-
1:2048	-	-
1:4096	-	-
1:8192	-	-
1: 16384	-	-
Антибактеріальна активність екстракту, AU/см ³	25 600	12 800

Антибактеріальна активність екстрактів, що містять коліцин М, з рослин T₂ покоління співмірна з виявленою активністю в екстрактах з рослин T₀ та T₁ покоління, які також культивували в умовах *in vitro* і складає 12 800-25 600 AU/см³. Таким чином, можемо припустити, що активність екстрактів з коліцином М, виділених з ліній T₂ покоління при культивуванні в умовах теплиці, не повинна бути нижчою, ніж у виділених з рослин T₀ та T₁ покоління.

На основі отриманих даних побудовано діаграму для візуалізації різниці активності коліцину М в залежності від умов культивувань. У якості додаткової вісі були додані значення діаметрів зон лізису нерозведених екстрактів для виявлення можливих закономірностей (рис. 2.3).

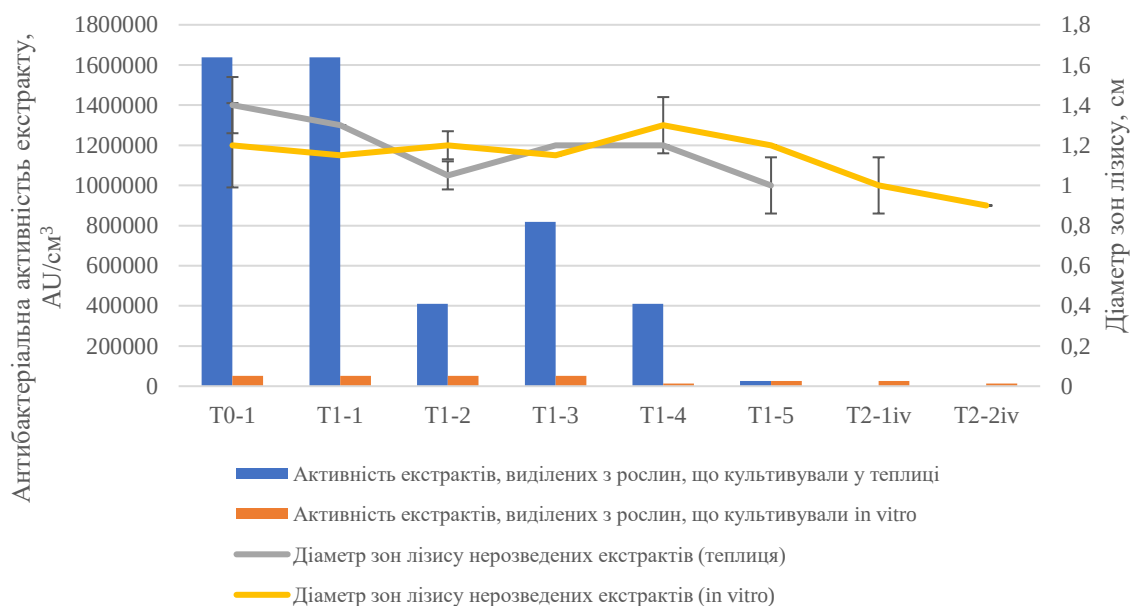


Рисунок 2.3 – Вплив умов культивування на антибактеріальну активність екстрактів листової біомаси капусти, що містять коліцину М

З діаграми видно, що чіткої залежності між діаметром зони лізису нерозведеного екстракту та антибактеріальної активності цього екстракту, не спостерігається. Видно, що діаметр зон лізису нерозведених екстрактів, виділених з рослин T1-2, T1-4 та T1-5, які культивували *in vitro*, є більшим, проте активність цих же екстрактів є нижчою, у порівнянні з тими ж лініями, що культивували у теплиці. Проте, якщо порівнювати між собою лінії вирощені в теплиці, то є певна залежність між діаметром зони інгібування нерозведеного екстракту та антибактеріальною активністю (МІК), що можна враховувати при первинному скринінгу при потребв в масовому тестуванні сіянців.

Проведене дослідження продемонструвало, що активність коліцину М у трансгенних рослинах різних поколінь значно підвищувалася при перенесенні рослин в умови теплиці, порівняно з рослинами, які культивували в умовах *in vitro*. Крім того, серед ліній одного покоління спостерігали певну варіабельність антибактеріальної активності. Аналіз літературних даних показав, що про варіабельність активності коліцину М серед нащадків трансгенних рослин повідомляли і у попередніх дослідженнях. Подібна

варіабельність спостерігалась для трансгенного салату T_1 та T_2 покоління у роботі Щербак зі співавторами [1].

Вочевидь, різниця в активності коліцину М може залежати від вмісту цього білка у різних клонах рослин, який, в свою чергу, залежить від рівня експресії цього гена. Подібне явище спостерігали як для стабільно трансформованого тютюну [4], так і для транзійтної експресії коліцину у *N. benthamiana* [50]. Можна припустити, що відбір найбільш продуктивних ліній та подальше їх розмноження в умовах *in vitro*, є перспективним підходом, щоб отримувати високоефективну стандартизовану сировину, яка продукує коліцин.

Для усіх екстрактів, які досліджували у попередньому розділі, було проведено вимірювання білка за методом Бредфорда. Отримані дані щодо оптичної густини (OG_{595}) були проаналізовані за критерієм Грабса для виключення грубих помилок, як було описано в п. 2.1.3. Усереднені значення оптичних густин для дослідних проб після виключення грубих похибок, а також калібровочні графіки наведені у додатку Б.

Концентрацію загального розчинного білка (ЗРБ) було визначено у зразках екстрактів за калібровочною кривою, побудованою на основі даних оптичних густин обраних концентрацій БСА (див. п. 2.1.3). Зведені дані щодо вмісту білка у трансгенних рослинах T_0 - T_2 покоління були використані для нормалізації активності коліцину на грам ЗРБ (табл. 2.5):

Таблиця 2.5 – Визначення вмісту білка у досліджуваних пробах та нормалізація антибактеріальної активності екстрактів з коліцином М на г загального розчинного білка (ЗРБ)

Лінія	Вміст білка, г/см ³	Антимікробна активність екстрактів, що містять коліцин М, AU/см ³	Антимікробна активність екстрактів, що містять коліцин М, AU/г ЗРБ
1	2	3	4
T0-1	0,0065	1638400	252 061 538
T0-1iv	0,0035	51200	14 628 571

Продовження таблиці 2.5

1	2	3	4
T1-1	0,0088	1638400	186 181 818
T1-1iv	0,0040	51200	12 800 000
T1-2	0,0080	409600	51 200 000
T1-2iv	0,0040	51200	12 800 000
T1-3	0,0078	819200	105 025 641
T1-3iv	0,0035	51200	14 628 571
T1-4	0,0043	409600	95 255 814
T1-4iv	0,0031	12800	4 129 032
T1-5	0,0037	25600	6 918 919
T1-5iv	0,0038	25600	6 736 842
T2-1iv	0,0032	25600	8 000 000
T2-2iv	0,0034	12800	3 764 706

У ході проведених досліджень було визначено, що антибактеріальна активність екстрактів з коліцином М на 1 г загального розчинного білка (ЗРБ) також вища у екстрактах трансгенних рослин, які культивували в тепличних умовах. Вочевидь, це пов'язано із тим, що у культурі *in vitro* метаболізм рослини змінюється і направляється, у першу чергу, на адаптацію до нових умов росту, проте відновлюється при поверненні в умови *in vivo*.

У попередніх дослідженнях підтверджується вищенаведена думка. Повідомляли, що метаболізм рослин в умовах *in vitro* може залежати від газообміну – внаслідок його порушення у дослідженнях з *Arabidopsis* spp. погіршується накопичення макро- та мікроелементів, метаболізм вуглеводів, і, як наслідок, погіршується ріст рослини [62].

Подібний вплив спостерігали у дослідженні з *N. tabacum*. Окрім пригнічення метаболізму вуглеводів та зниженої швидкості росту, повідомляли також про пригнічення фотосинтезу, зниження накопичення біомаси. Разом з тим спостерігали збільшення вмісту амінокислот та посилену експресію генів, що залучені у GS/GOGAT цикл, який бере участь у метаболізмі глютаміну та азотному обміні та може допомагати рослинам адаптуватись до умов культивування [63].

Проте, культивування трансгенних рослин у культурі *in vitro* може бути використано для попередньої селекції клонів продуцентів з високим вмістом цільового гетерологічного білка.

2.2.3 Дослідження стабільності коліцину М при зберіганні водних екстрактів трансгенної капусти, що експресує ген *ста*

Було проведено дослідження стабільності коліцину у нестерильних водних розчинах (екстрактах) при їх зберіганні за температури 2-8 °С. Для цього вивчали зміни в активності коліцину М в екстрактах трансгенних рослин методом серійних двократних розведень (див. додаток В). Виявили, що зменшення діаметру зон лізису спостерігається як зі збільшенням розведення, так і з часом.

Результати вимірювання діаметрів зон лізису та МІК наведені у табл. 2.6-2.9.

Таблиця 2.6 – Визначення МІК водних екстрактів з коліцином М при зберіганні (лінія T0-1)

	T0-1 (1 день)	T0-1 (2 день)	T0-1 (4 день)	T0-1 (5 день)
Розведення	d _{зон лізису} , см			
1	2	3	4	5
Вихідний екстракт	1,3	1,5	1,6	1,6
1:2	1,2	1,4	1,5	1,5
1:4	1,1	1,3	1,4	1,4
1:8	1,0	1,3	1,3	1,2
1:16	0,9	1,2	1,3	1
1:32	0,5	1,1	0,9	0,9
1:64	0,3	1,0	0,8	0,6
1:128	нд	0,9	0,4	0,3
1:256	нд	0,8	-	-
1:512	нд	0,8	-	-
1:1024	нд	нд	-	-
1:2048	нд	нд	-	-
1:4096	нд	нд	-	-
1:8192	нд	нд	-	-
Антибактеріальна активність екстракту, АУ/см ³	> 12 800	> 102 400	25 600	25 600

нд – не досліджували

Антибактеріальна активність екстрактів з коліцином М, виділених з лінії Т0-1, на 1 день зберігання перевищувала 12 800 АУ/см³ і не мала тенденції до зниження на 2 день (> 102 400 АУ/см³). На четвертий день спостерігається падіння активності коліцину М до 25 600 АУ/см³, і цей рівень активності зберігається і на 5 день.

Таблиця 2.7 – Визначення МІК водних екстрактів з коліцином М при зберіганні (лінія Т1-1)

	Т1-1 (1 день)	Т1-1 (2 день)	Т1-1 (4 день)	Т1-1 (5 день)
Розведення	d _{зон лізису} , см			
1	2	3	4	5
Вихідний екстракт	1,5	1,6	1,5	1,6
1:2	1,2	1,5	1,4	1,5
1:4	1,2	1,5	1,5	1,4
1:8	1,2	1,5	1,3	1,3
1:16	1,2	1,3	1,2	1
1:32	1,1	1,3	1,2	1
1:64	нд	1,0	1	0,7
1:128	нд	1,0	1	0,6
1:256	нд	0,8	1,1	0,3
1:512	нд	0,7	1	0,3
1:1024	нд	нд	0,8	-
1:2048	нд	нд	0,7	-
1:4096	нд	нд	0,4	-
1:8192	нд	нд	-	-
Антибактеріальна активність екстракту, АУ/см ³	> 6 400	> 102 400	819 200	102 400

нд – не досліджували

У перший день зберігання екстракту, виділеного з лінії Т1-1, його антибактеріальна активність була більшою за 6 400 АУ/см³. Аналогічно як з лінією Т0-1 на другий день зниження активності також не спостерігали (> 102 400 АУ/см³). Різке падіння активності спостерігається з 4 (819 200 АУ/см³) на 5 день зберігання (102 400 АУ/см³).

Таблиця 2.8 – Визначення МІК водних екстрактів з коліцином М при зберіганні (лінія Т1-2)

	T1-2 (1 день)	T1-2 (2 день)	T1-2 (4 день)	T1-2 (5 день)
Розведення	d _{зон лізису} , см			
1	2	3	4	5
Вихідний екстракт	1,3	1,2	1,3	1,2
1:2	1,2	1,0	1	1,1
1:4	1,0	0,9	0,9	1
1:8	1,0	0,7	0,9	0,7
1:16	0,9	0,4	0,6	0,6
1:32	0,8	0,2	0,4	0,4
1:64	0,6	-	-	-
1:128	0,5	-	-	-
1:256	0,3	-	-	-
1:512	-	-	-	-
1:1024	нд	нд	-	-
1:2048	нд	нд	-	-
1:4096	нд	нд	-	-
1:8192	нд	нд	-	-
Антибактеріальна активність екстракту, АУ/см ³	51 200	6 400	6 400	6 400

нд – не досліджували

У перший день зберігання екстракту, виділеного з лінії T1-2, його антибактеріальна активність дорівнювала 51 200 АУ/см³, але вже на другий день зберігання активність впала до 6 400 АУ/см³ і залишилась на цьому рівні до 5 дня зберігання екстракту.

Таблиця 2.9 – Визначення МІК водних екстрактів з коліцином М при зберіганні (лінія T1-3)

	T1-3 (1 день)	T1-3 (2 день)	T1-3 (4 день)	T1-3 (5 день)
Розведення	d _{зон лізису} , см			
1	2	3	4	5
Вихідний екстракт	1,2	1,3	1,3	1,3
1:2	1,0	1,1	1,2	1,2
1:4	0,9	1,1	1,0	1,0
1:8	1,0	0,9	1,0	0,9
1:16	0,7	0,9	0,8	0,8
1:32	0,6	0,8	0,5	0,5
1:64	нд	0,7	0,3	0,3
1:128	нд	0,3	-	-
1:256	нд	-	-	-
1:512	нд	-	-	-
1:1024	нд	нд	-	-

Продовження таблиці 2.9

1	2	3	4	5
1:2048	Нд	нд	-	-
1:4096	нд	нд	-	-
1:8192	нд	нд	-	-
Антибактеріальна активність екстракту, АУ/см³	> 6 400	25 600	12 800	12 800

нд – не досліджували

На перший день зберігання екстракту, виділеного з лінії Т1-3, його антибактеріальна активність була більшою за 6 400 АУ/см³. На другий день активність склала 25 600 АУ/см³, на четвертий – впала до 12 800 АУ/см³. Така активність зберігалась і на 5 день. Візуалізація динаміки падіння активності коліцину М при його зберіганні у формі екстракту наведена на рис. 2.4.

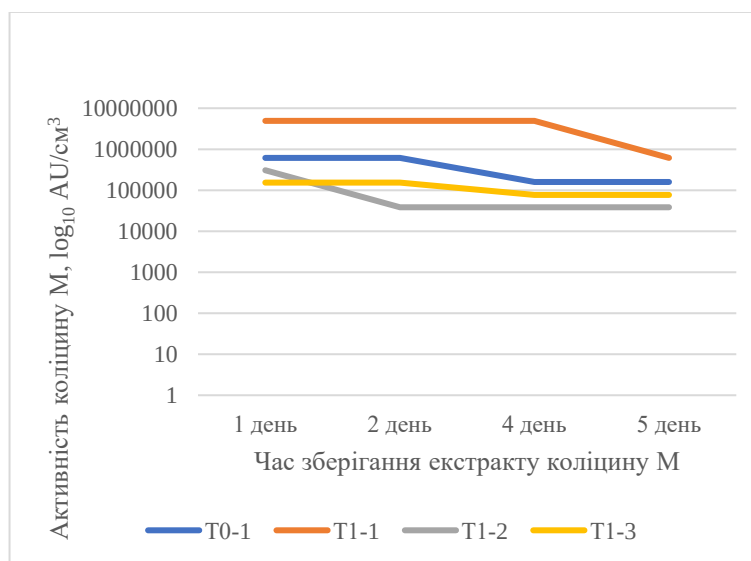


Рисунок 2.4 – Динаміка зниження антибактеріальної активності екстрактів, що містять коліцину М при зберіганні протягом 5 днів

З діаграми видно, що найвищу початкову антибактеріальну активність має екстракт, виділений з лінії Т1-1 (досить висока активність спостерігається навіть на 5 день зберігання екстракту), а найнижчу – з лінії Т1-3. Екстракт, виділений з лінії Т1-1, зберігає вихідний рівень активності до 4 дня зберігання,

після чого спостерігається досить різкий спад. Незважаючи на це, у кінцевій точці дослідження антибактеріальна активність екстракту T1-1 лишається найвищою серед усіх дослідних проб. Активність екстракту, отриманого з лінії T0-1, зберігається протягом 2 днів, після чого знижується і залишається на тому ж рівні на 5 день зберігання.

Найбільшу стабільність виявив екстракт з коліцином M, виділений з лінії T1-2: на другий день зберігання його антибактеріальна активність різко знижується, але надалі тримається на цьому ж рівні. Через різкий спад на 2 день зберігання екстракт на 5 день зберігання має нижчу активність, у порівнянні з екстрактом, виділеним з лінії T1-3, хоча у першій точці екстракт T1-3 мав меншу активність.

Можна припустити, що зниження активності коліцину M у водних екстрактах може бути спричинене дією протеаз рослини та мікроорганізмів у нестерильних умовах. Згідно з проаналізованою науково-технічною літературою, вивчення стабільності коліцину M при зберіганні у вигляді екстрактів раніше не проводили.

Таким чином, нами визначено, що у водних розчинах активність коліцину M в неочищених екстрактах за температури 2-8 °C зберігалася і втрата його активності складала приблизно на 1-2 порядки в день, хоча для деяких ліній спостерігається більша стабільність, що вказує на можливість їх практичного застосування.

2.2.4 Дослідження впливу висушування біомаси на активність коліцину M при довготривалому зберіганні

Було проведено дослідження впливу умов висушування біомаси капусти та тривалого зберігання біомаси (4 роки) за кімнатної температури. Для дослідження було використано зразки висушеної біомаси трансгенних рослин T₀ покоління, які були висушені за температури 40 °C протягом 4 днів або протягом 1 дня і зберігалися в кімнатних умовах в захищеному від світла місці протягом 4 років (рис. 2.5). Раніше, активність у цих зразках визначали

методом листових дисків та не проводили титрування, тому дані щодо одиниць активності за попередні роки відсутні.

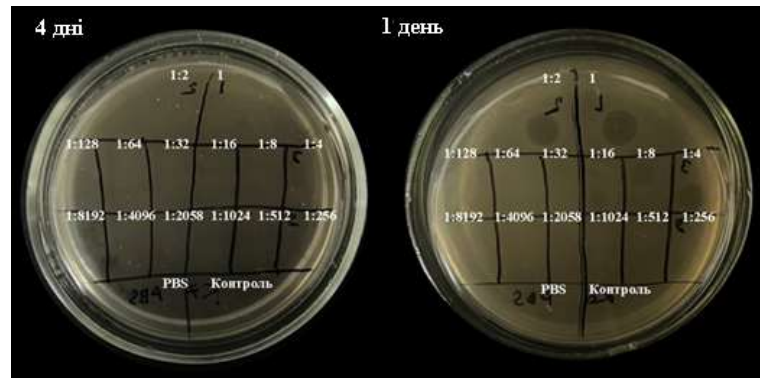


Рисунок 2.5 – Визначення активності коліцину М в екстрактах виділених з біомаси висушених листків трансгенних ліній капусти, що зберігались 4 роки

Результати вимірювання діаметрів зон лізису та МІК наведені у таблиці 2.10.

Таблиця 2.10 – Визначення МІК екстрактів з коліцином М, приготованих з висушеної біомаси після довготривалого зберігання (4 роки)

	4 дні сушіння, t=40 °C	1 день сушіння, t=40 °C
Розведення	d _{зон лізису} , см	
1	2	3
Вихідний екстракт	-	1,0
1:2	-	0,8
1:4	-	0,8
1:8	-	0,5
1:16	-	-
1:32	-	-
1:64	-	-
1:128	-	-
1:256	-	-
1:512	-	-
1:1024	-	-
1:2048	-	-
1:4096	-	-
1:8192	-	-

Продовження таблиці 2.10

1	2	3
Антибактеріальна активність екстракту, AU/см ³	0	1600

З таблиці видно, що при висушуванні біомаси протягом 4 днів за температури 40 °С активність коліцину М при довготривалому зберіганні за кімнатної температури відсутня. У той час як коліцин М, висушений протягом 1 дня при тій же температурі, на 4 рік зберігання має активність 1 600 AU/см³. Можна припустити, що тривале нагрівання приводить до зниження активності, а в комбінації з тривалим зберіганням приводило до цілковитої втрати активності, на відміну від екстрактів зі зразків, що сушилися протягом одного дня.

Було визначено антибактеріальну активність екстрактів із висушеної при температурі 40 °С протягом 2 днів біомаси трансгенної капусти (1 рік зберігання) (рис. 2.6).

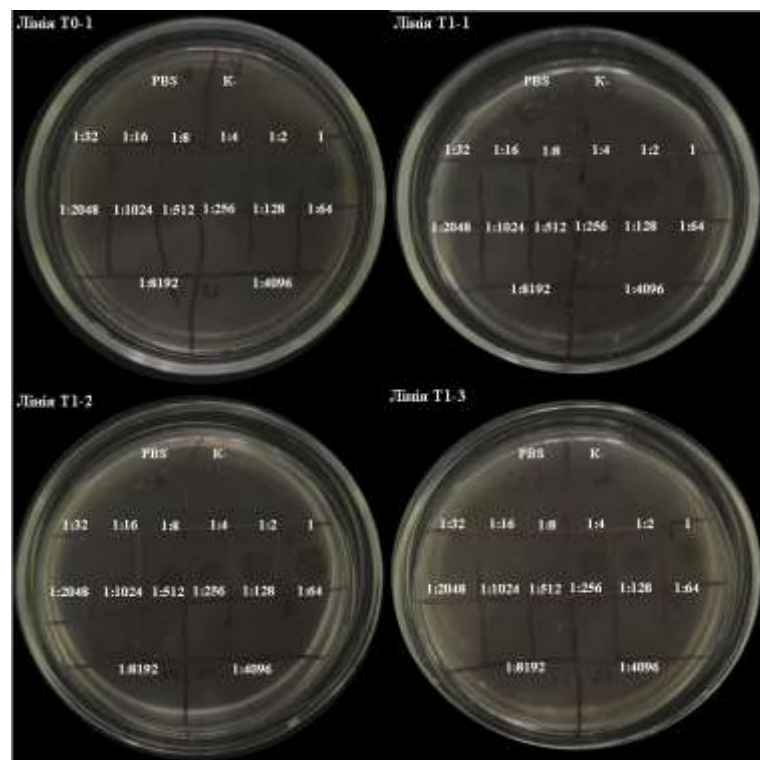


Рисунок 2.6 – Визначення активності коліцину М в екстрактах, виділених з біомаси висушених листків трансгенних ліній капусти, що зберігались 1 рік

Результати вимірювання діаметрів зон лізису та МІК наведені у таблиці 2.11.

Таблиця 2.11 – Визначення МІК екстрактів з коліцином М, приготованих з висушеної біомаси після довготривалого зберігання (1 рік)

	T0-1	T1-1	T1-2	T1-3
Розведення	d _{зон лізису} , см			
1	2	3	4	5
Вихідний екстракт	0,85 ± 0,07	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,95 ± 0,07
1:2	0,75 ± 0,07	0,90 ± 0,00	0,90 ± 0,00	0,90 ± 0,14
1:4	0,65 ± 0,07	0,80 ± 0,00	0,75 ± 0,07	0,80 ± 0,14
1:8	0,50 ± 0,00	0,80 ± 0,00	0,65 ± 0,07	0,50 ± 0,28
1:16	-	0,70 ± 0,00	0,40 ± 0,14	-
1:32	-	0,40 ± 0,14	-	-
1:64	-	-	-	-
1:128	-	-	-	-
1:256	-	-	-	-
1:512	-	-	-	-
1:1024	-	-	-	-
1:2048	-	-	-	-
1:4096	-	-	-	-
1:8192	-	-	-	-
Антибактеріальна активність екстракту, АУ/см ³	1 600	6 400	3 200	1 600

Отримані результати свідчать, що висушений матеріал капусти мав різну активність: лінія T1-1 (6 400 АУ/см³), T1-2 (3 200 АУ/см³), T0-1 та T1-3 мали нижчу активність – 1600 АУ/см³.

Для нормалізації активності коліцину М на вміст білка аналогічно проводили вимірювання вмісту білка методом Бредфорда. Середні значення оптичних густин для дослідних проб після виключення грубих похибок наведені, а також градувальний графік наведені у додатку Г.

Зведені дані щодо вмісту білка у висушених зразках були використані для нормалізації антибактеріальної активності коліцину на грам білка (табл. 2.12):

Таблиця 2.12 – Вміст білка у досліджуваних пробах біомаси капусти, які зберігалися протягом 1 року, та нормалізація антибактеріальної активності екстрактів з коліцином М

Лінія	Вміст білка, г/см ³	Антимікробна активність екстрактів, що містять коліцин М, AU/см ³	Антибактеріальна активність біомаси, що містять коліцин М, AU/г сир.* або сух. маси	Антимікробна активність екстрактів, що містять коліцин М, AU/г ЗРБ
1	2	3	4	5
Контроль	0,0017	0	0	0
T0-1	0,0021	1 600	60 000	761 904
T1-1	0,0057	6 400	240 000	1 122 807
T1-2	0,0019	3 200	120 000	1 684 211
T1-3	0,0040	1 600	60 000	400 000

З таблиці видно, що екстракт з лінії T1-1, що мав більшу активність коліцину, має і більший вміст білка. Проте, для екстрактів, отриманих з інших ліній, не спостерігали чіткої кореляції між активністю коліцину М та вмістом білка.

Аналогічно було визначено вплив короткочасного висушування біомаси за кімнатної температури при короткочасному зберіганні (див. рис. 2.7).

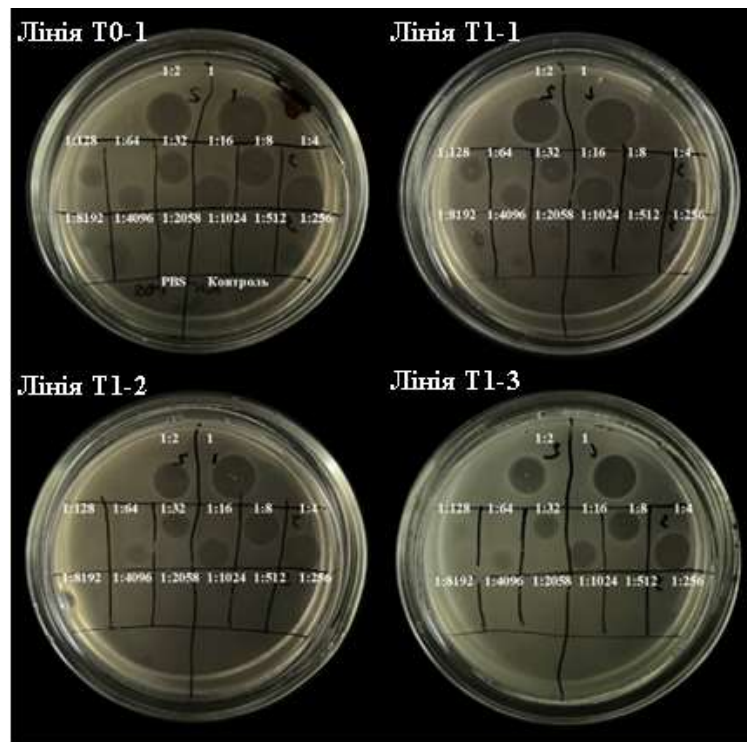


Рисунок 2.7 – Визначення активності коліцину М в екстрактах, виділених з висушених листків трансгенних ліній, що зберігали протягом 4 днів

Для цього листя, з якого були приготовані екстракти, попередньо було висушене за кімнатної температури протягом 4 днів. Результати вимірювання діаметрів зон лізису та МІК наведені у таблиці 2.13.

Таблиця 2.13 – Вплив короткочасного висушування коліцину М на антимікробну активність (4 дні)

	Лінія T0-1	Лінія T1-1	Лінія T1-2	Лінія T1-3
Розведення	d _{зон лізису} , см			
1	2	3	4	5
Вихідний екстракт	1,5	1,5	1,3	1,3
1:2	1,4	1,4	1,0	1,1
1:4	1,4	1,3	1,1	1,1
1:8	1,2	1,2	1,0	0,9
1:16	1,1	1,1	0,9	0,9
1:32	1,0	0,8	0,8	0,7
1:64	0,7	0,7	0,5	0,5
1:128	0,6	0,8	-	-
1:256	0,8	0,5	-	-
1:512	-	0,5	-	-
1:1024	-	0,3	-	-
1:2048	-	0,3	-	-

Продовження таблиці 2.13

1	2	3	4	5
1:4096	-	0,1	-	-
1:8192	-	-	-	-
Антибактеріальна активність екстракту, AU/см³	51 200	819 200	12 800	12 800

Згідно отриманих результатів, активність коліцину М в екстрактах з сушеної біомаси лінії з Т0-1 становить 51 200 AU/см³, з лінії Т1-1 – 819 200 AU/см³, з лінії Т1-2 та Т1-3 – 12 800 AU/см³. Як і для вимірювань активності коліцину М при зберіганні у водному розчині найвищу активність має екстракт, виділений з ліній Т0-1 та Т1-1, а найнижчу – з ліній Т1-2 та Т1-3.

Для формулювання висновків щодо стабільності коліцину у різних формах зберігання дані щодо антибактеріальної активності у екстракті на 4 день зберігання та при використанні свіжоприготовленого екстракту з біомаси, що зберігалася у вигляді висушеного листа, резюмовано у таблиці 2.14.

Таблиця 2.14 – Порівняння активності коліцину М при 4-денному зберіганні у формі екстракту та свіжоприготовленого екстракту, з висушеної біомаси через 4 дні зберігання

Лінія	Форма зберігання	Активність екстрактів, що містять коліцин М, AU/см ³
1	2	3
Т0-1	свіжа біомаса до висушування	1638400
	екстракт (4 дні)	25600
	висушене листя (4 дні)	51200
Т1-1	свіжа біомаса до висушування	1638400
	екстракт (4 дні)	819200
	висушене листя (4 дні)	819200
Т1-2	свіжа біомаса до висушування	409600
	екстракт (4 дні)	6400
	висушене листя (4 дні)	12800
Т1-3	свіжа біомаса до висушування	819200
	екстракт (4 дні)	12800
	висушене листя (4 дні)	12800

Через місяць зберігання висушеного листа робили повторне визначення антибактеріальної активності (рис. 2.8).

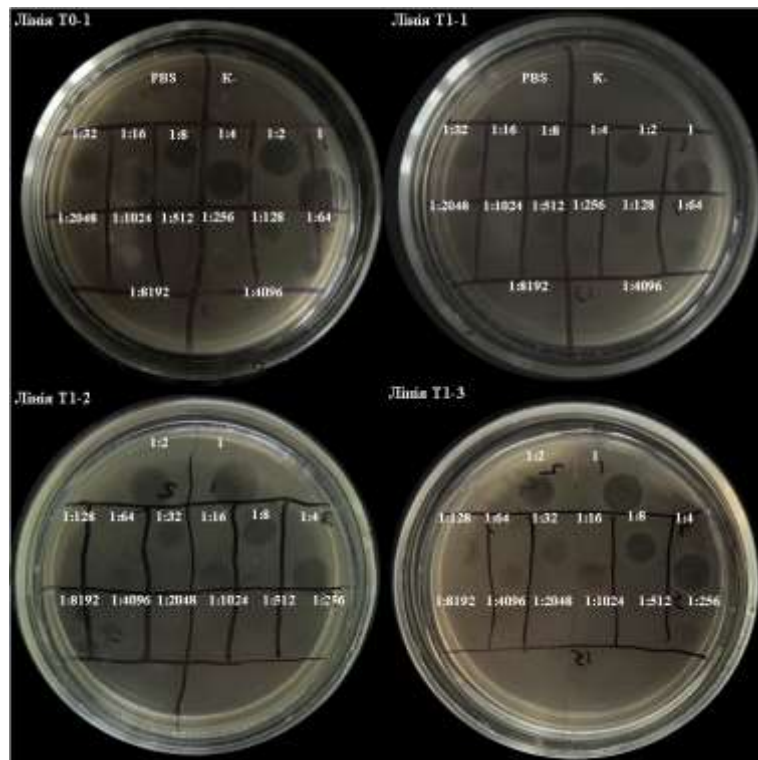


Рисунок 2.8 – Визначення активності коліцину М в екстрактах, виділених з висушених листків трансгенних ліній капусти, що зберігали протягом 1 місяця

Результати вимірювання діаметрів зон лізису та МІК наведені у таблиці 2.15.

Таблиця 2.15 – Вплив короткочасного висушування рослинного матеріалу капусти з коліцином М на антимікробну активність при зберіганні протягом 1 місяця

	Лінія T0-1	Лінія T1-1	Лінія T1-2	Лінія T1-3
Розведення	d _{зон лізису} , см			
1	2	3	4	5
Вихідний екстракт	1,40 ± 0,00	1,20 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
1:2	1,10 ± 0,00	1,17 ± 0,06	0,90 ± 0,00	0,90 ± 0,00
1:4	1,15 ± 0,07	1,03 ± 0,06	0,80 ± 0,00	0,83 ± 0,06
1:8	0,85 ± 0,07	1,00 ± 0,10	0,75 ± 0,07	0,77 ± 0,06
1:16	0,95 ± 0,07	0,90 ± 0,10	0,50 ± 0,00	0,73 ± 0,06
1:32	0,95 ± 0,07	0,80 ± 0,10	0,55 ± 0,07	0,57 ± 0,12

Продовження таблиці 2.15

1	2	3	4	5
1:64	$0,65 \pm 0,21$	$0,67 \pm 0,15$	$0,40 \pm 0,00$	$0,35 \pm 0,07$
1:128	$0,60 \pm 0,14$	$0,65 \pm 0,07$	-	-
1:256	-	$0,70 \pm 0,00$	-	-
1:512	-	$0,30 \pm 0,00$	-	-
1:1024	-	$0,30 \pm 0,00$	-	-
1:2048	-	-	-	-
1:4096	-	-	-	-
1:8192	-	-	-	-
Антибактеріальна активність екстракту, AU/см³	25600	204 800	12 800	12 800

Згідно отриманих результатів коліцин М, виділений з лінії T0-1 має активність 25 600 AU/см³, з лінії T1-1 – 204 800 AU/см³, з лінії T1-2 та T1-3 – 12 800 AU/ см³. Порівняно з попередньо отриманими результатами для цих зразків, спостерігається незначний спад активності для всіх ліній, окрім ліній T1-2 та T1-3.

Для нормалізації активності коліцину М на вміст білка аналогічно проводили вимірювання вмісту білка методом Бредфорда. Середні значення оптичних густин для дослідних проб після виключення грубих похибок, а також градувальний графік наведений у додатку Г.

Зведені дані щодо динаміки антибактеріальної активності при зберіганні висушеної біомаси за кімнатної температури наведені у таблиці 2.16.

Таблиця 2.16 – Визначення вмісту білка у досліджуваних пробах за короткочасного висушування рослинного матеріалу капусти з коліцином М при зберіганні протягом 1 місяця та нормалізація активності коліцину М на г ЗРБ

Лінія	Вміст білка, мг/см ³	Антибактеріальна активність екстрактів, що містять коліцин М, AU/см ³	Нормалізована активність екстрактів, що містять коліцин М, AU/г ЗРБ
1	2	3	4
T0-1	0,0048	25 600	5 333 333
T1-1	0,0053	204 800	39 009 524

Продовження таблиці 2.16

1	2	3	4
T1-2	0,0065	12 800	1 975 309
T1-3	0,0063	12 800	2 031 746

Отже отримані результати продемонстрували, що при висушуванні за кімнатної температури коліцин М в рослинному матеріалі зберігається краще, ніж при сушінні за температури 40 °С (див. табл. 2.13, 2.14).

Попередні дослідження свідчать, що активність коліцину М при зберіганні у формі висушеної біомаси може зберігатись протягом 9 місяців за температури -80 °С. Активність коліцину М незначно знижувалась, навіть, коли після 9 місяців зберігання біомасу висушували за температури 40 °С та зберігали протягом ще 3 місяців [1].

Таким чином, зберігання коліцину у вигляді біомаси висушеної за кімнатної температури є найбільш оптимальним режимом зберігання, який щонайменше місяць не спричиняє значного спадіння активності білка.

2.2.5 Перевірка антибактеріальної активності коліцину М при обробці зерна

Було проведено перевірку антибактеріальної активності коліцину М при обробці зерна порошком, зробленим з висушеної біомаси трансгенної капусти. Результати перевірки антибактеріальної активності коліцину М при обробці зерна наведені на рис. 2.9.

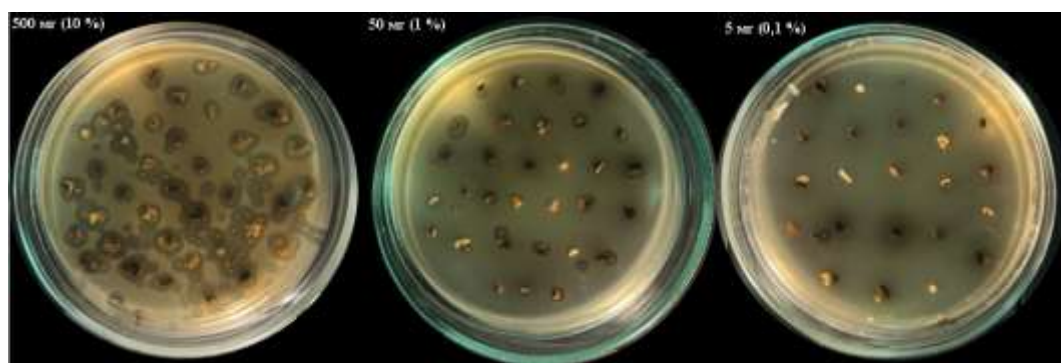


Рисунок 2.9 – Перевірка антибактеріальної активності порошку з висушеної біомаси трансгенної капусти при обробці зерна

Отримані дані узагальнено у таблиці 2.17.

Таблиця 2.17 – Обробка зерна коліцином М у вигляді висушеної біомаси

Зразок	Рецептура	% зерен з видимими зонами лізису
1	2	5
Контроль негативний	пшениця	0
Контроль негативний	пшениця + 1 % порошку з висушеної біомаси нетрансгенної капусти дикого типу	0
Контроль негативний	пшениця + 10 % порошку з висушеної біомаси нетрансгенної капусти дикого типу	0
Дослідний зразок 1	пшениця + 0,1 % порошку з висушеної біомаси трансгенної капусти з активністю коліцину $M \geq 15\ 000\ \text{AU/г}$	10,39
Дослідний зразок 2	пшениця + 1 % порошку з висушеної біомаси трансгенної капусти з активністю коліцину $M \geq 15\ 000\ \text{AU/г}$	86,36
Дослідний зразок 3	пшениця + 10 % порошку з висушеної біомаси трансгенної капусти з активністю коліцину $M \geq 15\ 000\ \text{AU/г}$	100

Отримані результати показують, що пшениця без обробки та оброблена порошком нетрансгенної капусти не проявляла антимікробної активності в жодній з використаних концентрацій порошку нетрансгенної капусти. Використання 0,1 % (від маси пшеничної крупи) порошку з висушеної біомаси трансгенної капусти з активністю коліцину М не менше 15 000 AU/г сухої ваги не можна вважати ефективним, через складнощі рівномірного перемішування та складність візуального визначення малих зон інгібування росту на газоні бактерій. Додавання 1 % порошку трансгенної капусти дозволяло рівномірніше перемішувати суміш та приводило до формування добре помітних неозброєним оком зон пригнічення бактеріального росту навколо 86 % зерен. При застосуванні порошку капусти в кількості 10 % від маси обробленого зерна, спостерігали яскраво виражені зони інгібування навколо 100 % оброблених зерен, при цьому легше було досягнути рівномірного змішування компонентів. Можна припустити, що використання 2-5 % добавки, є біологічно та економічно виправданим при створенні формуляцій

комбікорму з антимікробними властивостями проти патогенних *E. coli*. Точніше визначення кількості порошку сушеної коліциновмісної сировини, який треба додавати до комбікорму можна визначити при тестуванні експериментальних формуляцій на тваринах.

Критично важливим було забезпечити рівномірне нанесення порошку сушеної капусти на поверхню зерна та його перемішування. Для прилипання порошку до зерна, використовували харчову олію в кількості 4 % об'єм/маса. При подальших розробках продукту, можна спробувати замінити олію, яка потенційно може прогоркати та є досить дорогою, на дешевший розчин меляси, або інші аналоги прилипачів. Можна припустити, що при використанні професійних змішувачів, потреба в прилипачі може бути меншою.

Отже, використання порошку висушеної біомаси для обробки зерна проти *E. coli* показало ефективність при використанні порошку у кількості 1-10 % від маси зерна. При чому при менших зонах інгібування протективний ефект також є. Додатковою перевагою такої форми використання продукту є те, що коліцин не потребує окремого етапу очистки та приготування порошку є біофортифікованим, тобто має досить високий вміст білків (до 36,8 % сухої речовини та до 11,67 % у свіжій сировині), вміст харчових волокон (до 36,8 % сухої речовини та до 8,39 % у свіжій сировині), фолієвої кислоти (до 29 мг/100 г), фенолів (до 1167 мг/100 г), флавоноїдів (у тому числі кемпферолу - до 537 мг/100 г, кверцетину - до 319 мг/100 г), глюкосинолатів (до 41 мкмоль/г сухої ваги), вітаміну С (до 969 мг/100 г), вітамінів групи В, а також селену (до 0.0023 мг/100 г), калію (до 1350 мг/100 г), магнію (до 44 мг/100 г) та біодоступного кальцію (до 1970 мг/100 г) [7].

3. РОЗРОБКА СТАРТАП ПРОЄКТУ

3.1 Резюме стартап проєкту

Резюме розробленого стартап проєкту наведена у табл. 3.1:

Таблиця 3.1 – Резюме стартап проєкту

Показник	Характеристика
1	2
1. Сутність ідеї	Виробництво кормових добавок з антибактеріальною активністю та високим вмістом біоактивних речовин, білка.
2. Наявність аналогів або прототипів ідеї	Наявні серед відчизняних і зарубіжних компаній (США, Бельгія).
3. Основна потреба, яку задовольнить реалізований стартап	- зниження витрат на лікування тварин від ешерихіозів за рахунок профілактичних заходів; - забезпечення збалансованого годування тварин; - розширення продуктового портфеля дистриб'юторів ветеринарних препаратів.
4. Ступінь розробленості технології реалізації	Промислове впровадження.
5. Класифікація продукту стартапу за міжнародною класифікацією товарів	Клас 5: Фармацевтичні, медичні та ветеринарні препарати; дієтичні харчові продукти і речовини, призначені для медичного чи ветеринарного використання, продукти для дитячого харчування; дієтичні добавки для людей і для тварин. Клас 42: Наукові і технологічні послуги та досліджування і розробки, що їх стосуються. Клас 44: Медичні послуги; ветеринарні послуги; гігієнічне та косметичне обслуговування людей або тварин; послуги в сільському господарстві, аквакультурі, плідівництві та лісівництві.
6.КВЕД, до якого може належати дане виробництво	КВЕД 21.20: Виробництво фармацевтичних препаратів і матеріалів. КВЕД 72.11: Дослідження й експериментальні розробки у сфері біотехнологій. КВЕД 01.11: Вирощування зернових культур (крім рису), бобових культур і насіння олійних культур. КВЕД 01.15: Вирощування тютюну. КВЕД 01.19: Вирощування інших однорічних і дворічних культур.
7. Очікувана потужність стартапу	Середнє підприємство.
8. За масштабом виробництва	Серійне.
9. За рівнем спеціалізації	Комбіноване.

Продовження таблиці 3.1

1	2
10. За ресурсами, що споживатимуться	Працемістке, матеріаломістке, капіталомістке.
11. За чисельністю персоналу	Середнє.
12. Органи управління при реалізації стартапу	Національні.
13. Бажане географічне розташування - потужностей стартапу; - офісу стартапу; - збутової мережі; - постачальників комплектуючих.	Потужності та офіс стартапу плануються розташовуватись у промислово розвинених регіонах України з добре розвинуеною логістикою (Київ, Київська область). Збутова мережа охоплює всі регіони України, а найбільшу цінність для стартапу становлять області з розвиненим аграрним сектором. Постачальники комплектуючих мають розташовуватись в межах Київської області для скорочення витрат на логістику, проте не виключаються постачальники з інших регіонів України.
14. Місце ідеї у ланцюжку цінностей інноваційного процесу	Ідея, розробка, впровадження, виробництво.
15. Гранична корисність ідеї стартапу	Висока гранична корисність через потенційне зменшення використання антибіотиків у господарствах
16. Бізнес-модель стартапу	B2B.
17. Конкуренти вітчизняні (ціна, на якому етапі реалізації знаходяться, основні конкурентні переваги, фактори успіху)	Підкислювачі кормів Кроноцид-Д (Кронос-Агро), Бакцинол, СК-450, СК-650 (ВетСинтез): діють неспецифічно за рахунок зниження рН корму, більш звичні у практичному використанні для споживача, мають невисоку ціну. Дані конкурентні компанії є одними з найбільших постачальників кормових добавок та препаратів з власним виробництвом, що відповідає вимогам GMP.
18. Конкуренти іноземні (ціна, на якому етапі реалізації знаходяться, основні конкурентні переваги, фактори успіху)	Підкислювач корму Новібак Л® (Innovad Group): діє неспецифічно за рахунок зниження рН корму, більш звичний у практичному використанні для споживача, має невисоку ціну. Innovad Group має власне виробництво, що відповідає вимогам GMP. До продуктів-конкурентів даного стартапу також віднесено парогенератори для обробки кормів (Clayton Industries). Хоча ефективність термічної обробки при правильно підбраному режимі стерилізації може бути більш ефективною, ніж застосування підкислювачів, все ж парова стерилізація потребує значних капіталовкладень від споживачів, а також додаткового персоналу для роботи з парогенератором.

Продовження таблиці 3.1

1	2
19. Ключові фактори успіху стартапу	Окрім антибактеріальної активності, кормова добавка збагачує корм рядом біологічно активних речовин, є додатковим джерелом білка у раціоні тварин. Розроблена кормова добавка за способом використання не відрізняється від підкислювачів корму.
20. Споживачі (основні на етапі впровадження, групи, орієнтовна чисельність)	Ферми (від 50 господарств), дистриб'ютори ветеринарних препаратів (5+ підприємств).
21. Планова кількість продукту розробки для першого етапу реалізації	2167 кг продукту на місяць, 26 000 кг продукту на рік.
22. Мінімальна кількість виробництва за методом точки безбитковості	3500 кг продукту на рік.
23. Споживачі на етапі розвитку	Малі ферми та дистриб'ютори.
24. Споживачі на етапі зрілості	Середні ферми та дистриб'ютори.
25. Конкурентна ціна на продукт стартапу	850 грн/кг.
26. Плановий рівень рентабельності при реалізації продукту	114,19 % на рік.
27. Капіталовкладення в проєкт	-всього: 11 617 703,70 грн; -на одиницю продукції: 446,83 грн.
28. Період повернення капіталовкладень у проєкт	0,99 роки.
29. Джерела фінансування	Внутрішні (власні кошти) та зовнішні (гранти, кредити вітчизняних та іноземних установ, бюджетні інвестиції).
30. Основні компоненти продукції стартапу (їх доля у готовому товарі, ступінь готовності компонентів у наявному виробництві)	Сировина та матеріали (1,27 %), комунальні послуги (16,8 %), оренда (7,75 %), обладнання (12,43 %), заробітня плата (61,75 %). Не готові, виробництво знаходиться на стадії проєктування.
31. Потенційні постачальники складових компонентів розробки (виділити вітчизняних і закордонних, плановий обсяг замовлень, наявна потужність постачальника)	Відчизняні: ТОВ «УКРАНАЛІТИКА» (3 позиції, постачальник загальнолабораторного обладнання), ТОВ «ХІМЛАБОРРЕАКТИВ» (65 позицій, головний постачальник сировини та матеріалів), ТОВ «ХІМТЕСТ УКРАЇНА +» (7 позицій, постачальник загальнолабораторного обладнання), ТОВ НВП «МІКРОМЕД» (6 позицій, постачальник загальнолабораторного обладнання),

Кінець таблиці 3.1

1	2
31. Потенційні постачальники складових компонентів розробки (виділити вітчизняних і закордонних, плановий обсяг замовлень, наявна потужність постачальника)	ТОВ «АЛТ УКРАЇНА ЛТД» (2 позиції, постачальник специфічних реагентів), ТОВ «Епіцентр К» (11 позицій, основний постачальник товарів господарського призначення), ТОВ «ВСК» ФРОСТЛЕНД» (1 позиція, постачальник низькотемпературного холодильника), ПП «СИСТЕМА ОПТИМУМ» (3 позиції, постачальник ряду реактивів та загальнолабораторного обладнання).
32. Планове місце реалізації результату розробки (місце, планова доля реалізації продукту через це місце)	Внутрішній ринок країни (100 %).
33. Наявність посередників при реалізації (так, ні, орієнтовні посередники, форми оплати їх діяльності)	Так. Дистриб'ютори ветеринарних продуктів для сільськогосподарських тварин: ТОВ «УКРВЕТ», ТОВ «УКРФЕРМА», ТОВ «ВІ ГРУП». Форма оплати діяльності: відсоток від обсягу продажів.
34. Методи просування результатів розробки на ринок	Реклама, особистий продаж.

3.2 Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища стартапу

Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища стартапу наведено у табл. 3.2:

Таблиця 3.2 – Аналіз загроз і можливостей зовнішнього середовища

Фактор	Загрози	Можливості
1	2	3
Економіка		
1. Зміна рівня інфляції	- знецінення вкладених коштів; - збільшення собівартості продукту за рахунок збільшення витрат на виробництво.	+ оптимізація виробничого процесу для зниження витрат; + зниження конкуренції серед малих підприємств.
2. Зміни в системі оподаткування	- зменшення чистого прибутку; - збільшення оперативних витрат.	+ використання податкових пільг; + оптимізація структурної організації компанії,

Продовження таблиці 3.2

1	2	3
2. Зміни в системі оподаткування		спрямування певних видів робіт на аутсорс.
3. Купівельна спроможність споживача	- скорочення обсягів виробництва; - зниження рівня прибутків, зменшення рентабельності стартапу.	+ вихід на міжнародний ринок для пошуку споживачів з більшою купівельною спроможністю.
4. Виділення державних грантів для розвитку малого та середнього бізнесу	- збільшення конкуренції за фінансування; - можлива зміна політики, скорочення грантів.	+ отримання додаткових фінансових ресурсів; + підвищення впізнаваності стартапу та безкоштовне просування.
Політика		
1. Зміна законодавчих вимог щодо виробництва рекомбінантних білків у трансгенних рослинах	- труднощі у процедурі реєстрації трансгенних рослин; - збільшення витрат на приведення виробництва до нових норм.	+ розширення ринків збуту на території ЄС при гармонізації законодавства; + підвищення довіри споживачів до продукції за рахунок відповідності до нових регуляторних вимог.
2. Зміни у законодавчих вимогах щодо питань інтелектуальної власності у сфері біотехнологій	- недостатній захист об'єкту інтелектуальної власності, втрата УТП.	+ отримання міжнародних патентів для більшого захисту об'єкту інтелектуальної власності.
3. Зміни у законодавчих вимогах щодо реєстрації кормових добавок для застосування у ветеринарії	- труднощі у реєстрації готового продукту.	+ розширення ринків збуту на території ЄС при гармонізації законодавства.
4. Військові дії	- втрата матеріального забезпечення стартапу; - загроза життю та здоров'ю персоналу.	+ знижена конкуренція, можливість зайняття великої частки ринку; + можливість використання грантових програм для бізнесу, що працюють під час війни.
Науково-технічний прогрес		
1. Створення більш продуктивних систем експресії коліцину М	- зменшення конкурентної переваги; - втрата частини клієнтів.	+ оптимізація виробництва для збільшення виходу продукту.

Кінець таблиці 3.2

1	2	3
2. Використання інших, більш ефективних агентів чи методів обробки кормів	- втрата частини клієнтів.	+ можливість розширення асортименту продукції; + формування додаткових конкурентних переваг.
Географія		
1. Зміна клімату	- погіршення умов культивування продуценту.	+ культивування продуценту у теплицях без ризику потрапляння трансгену у екосистеми та незалежно від клімату.
2. Розташування виробництва у невеликих містах чи селах	- можливі логістичні складнощі; - віддаленість від науково-дослідних центрів; - складнощі у підборі персоналу.	+ менші витрати на оренду землі та приміщення.
Демографія		
1. Міграція населення	- зменшення ринку збуту.	+ вихід на міжнародні ринки.
2. Кількість спеціалістів у галузі біотехнологій, генетичної інженерії	- дефіцит кваліфікованих кадрів.	+ популяризація біологічних спеціальностей, залучення студентів (можливість стажування).
Культура		
1. Суспільне ставлення щодо ГМО	- недовіра та забобони щодо ГМО та продукції, отриманих за допомогою ГМО.	+ участь у публічних обговореннях, що дає спростувати хибні припущення і збільшити впізнаваність компанії.
2. Недовіра до нового продукту	- складнощі з продажем продукту.	+ можливість формування бренду, побудова відповідної маркетингової стратегії.

Аналіз факторів зовнішнього оперативного середовища наведений у табл. 3.3:

Таблиця 3.3 – Аналіз факторів зовнішнього оперативного середовища

Фактор	Переваги	Недоліки
1	2	3
1. Конкуренти		
ПП «Кронос Агро», Україна (продукт Кроноцид-Д)	+ мають власне виробництво; + впроваджені системи контролю якості ISO 9001:2009 та ISO 22000:2005 (НАССР); + є можливість розробки, оптимізації добавок під запит клієнта; + наявні підкислювачі на основі органічних кислот, зареєстровані в Україні, мають невелику витрату (1-2 кг на 1 тону корму, великий термін придатності (до 3 років).	- відсутня інформація стосовно лояльностей для оптових покупців; - неспецифічна дія щодо мікроорганізмів (не виключається розвиток ацидофільних мікроорганізмів); - вживання корму з низьким рН може призвести до подразнення шлунково-кишкового тракту, корозії годівниць.
ТОВ «ВетСинтез», Україна (продукт Бакцинол, СК-450, СК-650)	+ власне виробництво, що відповідає стандартам GMP та GMP+; + впроваджена система контролю якості ISO 9001:2015; + широкий асортимент продукції: від антибіотиків до кормових добавок; + підкислювачі на основі органічних кислот, зареєстровані в Україні, мають невелику витрату (до 3 кг на 1 тону корму), термін придатності до 2 років.	- відсутня інформація стосовно лояльностей для оптових покупців; - неспецифічна дія щодо мікроорганізмів (не виключається розвиток ацидофільних мікроорганізмів); - вживання корму з низьким рН може призвести до подразнення шлунково-кишкового тракту, корозії годівниць.
Anitox Corporation, США (продукт Finio®)	+ власне виробництво; + запатентовані продукти, що включають підкислювачі як на основі органічних кислот (Finio®), так і фенольних сполук; + низька витрата продукту (до 2 кг), широкий спектр дії.	- відсутні дані щодо реєстрації кормових добавок, тому вони, ймовірно, мають обмеження на ввезення; - невелика лінійка продуктів. - неспецифічна дія щодо мікроорганізмів (не виключається розвиток ацидофільних мікроорганізмів); - вживання корму з низьким рН може призвести до подразнення шлунково-кишкового тракту, корозії годівниць.
Innovad Group, Бельгія (продукт Новібак Л®)	+ власне виробництво, що відповідає стандартам GMP; + широкий асортимент продукції (кормові добавки, вітаміни, засоби для покращення роботи кишківника); + підкислювач на основі органічних кислот, зареєстрований в Україні, має невелику витрату (до 3 кг на 1 тону корму), термін придатності до 2 років.	- неспецифічна дія щодо мікроорганізмів (не виключається розвиток ацидофільних мікроорганізмів); - вживання корму з низьким рН може призвести до подразнення шлунково-кишкового тракту, корозії годівниць.

Продовження таблиці 3.3

1	2	3
Clayton Industries, США	+ власне виробництво парогенераторів для різних галузей; + працюють з великими компаніями.	- необхідність проведення додаткових досліджень для визначення оптимального режиму стерилізації; - можливе погіршення харчових властивостей корму.
ТОВ «ОЗОН-ПРОМ», Україна	+ власне виробництво побутових та промислових установок для генерації озону; + надання послуг з озонування.	- необхідність проведення додаткових досліджень щодо підтвердження ефективності даного методу обробки в умовах господарства.
2. Постачальники		
ТОВ «УКРАНАЛТИКА»	+ є послуга навчання персоналу роботи з приладами; + є гарантійне сервісне обслуговування; + є послуга калібрування приладів; + широкий асортимент необхідного лабораторного обладнання	- відсутня інформація щодо лояльностей для оптових покупців.
ТОВ «ХІМЛАБОР РЕАКТИВ»	+ є постачальниками лабораторних меблів, обладнання, хімічних реактивів; + можливість підбору товарів персональним менеджером; + можлива доставка замовлення на авто компанії.	- немає послуги навчання персоналу роботі з обладнанням; - немає послуги з калібрування приладів.
ТОВ «ХІМТЕСТ УКРАЇНА +»	+ є послуга навчання персоналу роботі з обладнанням; + можливість виїзду для запуску та налаштування обладнання; + постгарантійне обслуговування та послуга ремонту обладнання; + широкий вибір лабораторних меблів, обладнання, хімічних реактивів.	- відсутня інформація стосовно лояльностей для оптових покупців; - у вільному доступі відсутня інформація стосовно доставки.
ТОВ НВП «МІКРОМЕД»	+ виробник бере участь у тендерних закупівлях; + безкоштовна доставка на замовлення від 10 тис.грн; + є сервісне обслуговування; + широкий асортимент лабораторного обладнання та витратних матеріалів.	- не є постачальником хімічних реактивів.
ТОВ «АЛТ УКРАЇНА ЛТД»	+ офіційний постачальник продукції ThermoFisher Scientific, Leica, Hitachi; + великий вибір обладнання для молекулярної біології, загальнолабораторного обладнання.	- в загальному доступі немає умов щодо оптових закупівель.
ТОВ «Елісен тр К»	+ широкий асортимент товарів; + зручна доставка; + партнер програми «ЄВІДНОВЛЕННЯ»;	- через наявності на маркетплейсі товарів від різних продавців, можливі проблеми з якістю.

Кінець таблиці 3.3

1	2	3
ТОВ «Еліцентр К»	+ є система лояльності; + безкоштовна доставка на замовлення більше 5 тис. грн; + є окремий портал для бізнес-клієнтів з лояльностями для оптових закупівель.	
ТОВ «ВСК» ФРОСТ ЛЕНД»	+ широкий вибір промислового холодильного обладнання; + можливість монтажу, сервісного обслуговування обладнання.	- не є постачальником побутової холодильної техніки.
ПП «СИСТЕМА ОПТИМУМ»	+ є лояльності для гуртових покупців (персональні знижки, пряма доставка); + є дозвіл на фасування небезпечних речовин; + широкий асортимент хімічних реактивів.	- є мінімальний ліміт на замовлення (від 3 тис. грн).
3. Посередники		
Prom.ua	+ можливість створення власного домену; + фіксована абонентська ставка; + інтеграції з іншими торговельними майданчиками та логістичними компаніями (Rozetka, Нова Пошта, Meest).	- абонентська плата не враховує відсутність продажів; - відсутність безкоштовних опцій доставки від маркетплейсу.
ТОВ «Еліцентр Marketplace»	+ опція безкоштовної доставки у пункти самовивозу або поштомати; + низька абонентська плата.	- відсутність окремого домену та можливості відокремити свої товари; - досить велика комісія за виконані замовлення (у категорії “Зоотовари” складає 15 %).
Сектор В2В (фермерські господарства)	+ регулярність споживання, можливість прогнозування попиту; + можливість залучення безкоштовних методів просування (“сарафанне радіо”).	- чутливість до ціни; - недотримання умов використання, через що можуть виникнути сумніви у ефективності продукту; - можлива недовіра до інноваційних продуктів.
4. Споживачі		
Сектор В2В (дистриб'юто ри кормових добавок)	+ відсутня необхідність самостійно шукати клієнтську базу; + передбачуваність закупівель (мінімальний обсяг закупівель фіксується в договорі).	- можлива велика конкуренція через наявність подібних препаратів; - великі дистриб'ютори, як правило, зацікавлені у роботі з великими виробництвами.

На основі аналізу зовнішнього оперативного середовища було здійснено аналіз зацікавлених сторін, представлений у таблиці 3.4.

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
Суб'єкти зовнішнього оперативного середовища			
1. Конкуренти			
ПП "Кронос Агро", Україна (продукт Кроносид-Д)	5	3	4
ТОВ "ВетСинтез", Україна (продукт Бакцинол, СК-450, СК-650)	5	3	4
Anitox Corporation, США (продукт Finio®)	2	2	2
Innovad Group, Бельгія (продукт Новібак Л®)	4	3	3,5
Clayton Industries, США	2	1	1,5
ТОВ «ОЗОН-ПРОМ», Україна	2	1	1,5
2. Постачальники			
ТОВ «УКРАНАЛІТИКА»	3	3	3
ТОВ «ХІМЛАБОРРЕАКТИВ»	3	4	3,5
ТОВ «ХІМТЕСТ УКРАЇНА +»	3	4	3,5
ТОВ НВП «МІКРОМЕД»	3	4	3,5
ТОВ «АЛТ УКРАЇНА ЛТД»	3	3	3
ТОВ «Епіцентр К»	3	2	2,5
ТОВ «ВСК» ФРОСТЛЕНД»	3	1	2
ПП «СИСТЕМА ОПТИМУМ»	3	3	3
3. Посередники			
Prom.ua	3	2	2,5
ТОВ «Епіцентр Marketplace»	4	2	3
4. Споживачі			
Сектор В2С (фермерські господарства)	5	3	4
Сектор В2В (дистриб'ютори кормових добавок)	4	3	3,5

Продовження таблиці 3.4

1	2	3	4
Зовнішнє середовище			
1. Політичні структури			
Державна податкова служба	5	4	4,5
Держспоживслужба	4	4	4
Міністерство освіти і науки	3	2	2,5
Український інститут інтелектуальної власності	4	3	3,5
2. Суб'єкти економічного середовища			
Міністерство економіки України	5	4	4,5
USAID	4	3	3,5
Norad – The Norwegian Agency for Development Cooperation	3	3	3
3. Власники географічних об'єктів			
-	-	-	-
4. Суб'єкти демографії			
Населення України	4	2	3
5. Суб'єкти культурного середовища			
Науково-популярні видавництва	4	4	4
6. Суб'єкти НТП			
Науково-дослідні інститути	3	4	3,5
Приватні виробники кормових добавок з R&D відділом	4	4	4

Аналіз переваг та недоліків внутрішнього середовища наведений у табл. 3.5:

Таблиця 3.5 – Переваги і недоліки внутрішнього середовища

Фактор	Переваги	Недоліки
1	2	3
Організаційна структура	+ лояльне керівництво з наявним виробничим досвідом у сфері генетичної інженерії рослин.	- недостатність досвіду керування компанією.

Продовження таблиці 3.5

1	2	3
Імідж	+ інноваційна компанія; + боротьба з антибіотикорезистентністю.	- частина покупців на перших етапах можуть не зрозуміти продукт, мати певні застереження.
Виробничий потенціал	+ можливість отримувати високий виїд біомаси круглий рік (50-60 тон/гектар).	- необхідність культивування рослин у теплицях через обмеження законодавства.
Конкурентний потенціал	+ виробництво кормових добавок, які одночасно володіють як антибактеріальними властивостями, так і є додатковим джерелом активних речовин та білка в раціоні тварин.	- необхідність просвітницької діяльності щодо ГМО та продуктів отриманих з них, демонстрація ефективності продукту.

За результатами аналізу визначено, що об'єктом стартап проєкту є інноваційна ідея (застосування коліцинів у ветеринарії для профілактики ешерихіозів) та технологія (біофортифікована кормова добавка, що має антибактеріальні властивості).

3.3 Визначення ключових факторів успіху проєкту

Ключові фактори успіху проєкту представлені у вигляді діаграми Шонфільда (табл. 3.6):

Таблиця 3.6 – Оцінка характеристик стартапу за методом Шонфільда

Характеристика	Коефіцієнт вагомості	Оцінка характеристик				
		Наш продукт	Кроноци д-Д	Бакцино л	Новібак Л®	Парогенератори
1	2	3	4	5	6	7
Ціна	0,20	2	4	2	4	2
Спектр антибактеріальної активності	0,25	2	4	4	4	2
Вплив на харчову цінність корма	0,25	5	2	2	2	1

Продовження таблиці 3.6

1	2	3	4	5	6	7
Простота застосування	0,20	5	5	5	5	3
Наявність інших ветеринарних продуктів в асортименті	0,10	2	4	5	4	1

З урахуванням коефіцієнту вагомості характеристики визначаємо бальну оцінку характеристик (табл. 3.7):

Таблиця 3.7 – Бальна оцінка характеристик стартапу за методом Шонфільда

Характеристика	Коефіцієнт вагомості	Оцінка характеристик				
		Наш продукт	Кроноцид-Д	Бацинол	Новібак Л®	Парогенератори
1	2	3	4	5	6	7
Ціна	0,20	0,4	0,8	0,4	0,4	0,4
Спектр антибактеріальної активності	0,25	0,5	1	1	1	0,5
Вплив на харчову цінність корма	0,25	1,25	0,5	0,5	0,5	0,25
Простота застосування	0,20	1	1	1	1	0,6
Наявність інших ветеринарних продуктів в асортименті	0,10	0,2	0,4	0,5	0,4	0,1

На основі даних з таблиці 3.7 формуємо графік (рис. 3.1):

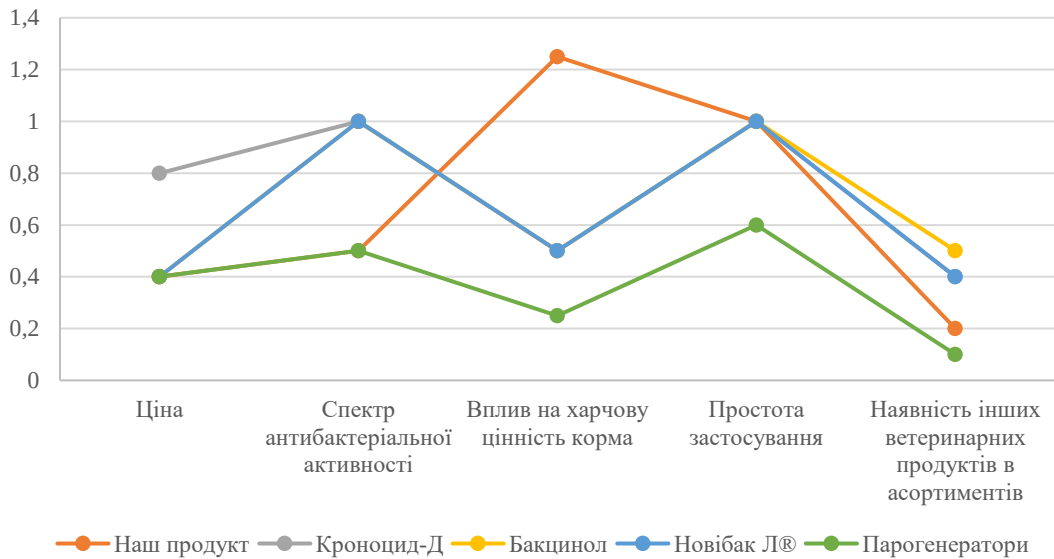


Рисунок 3.1 – Порівняння конкурентних переваг підприємства з конкурентами

Порівнюючи наш продукт з конкурентами, наша кормова добавка краще впливає на харчову цінність корму, а також досить проста у використанні. Але порівняно з конкурентами ми не маємо широкого асортименту інших ветеринарних продуктів, а спектр антибактеріальної активності досить вузький і спрямований проти розвитку *E. coli*, у той час як підкислювачі діють неспецифічно. Таким чином, ключовими напрямками розвитку інноваційної ідеї є збільшення продуктового портфелю компанії, а також розробки комбінованого препарату (наприклад, з додаванням сальмоцинів, піоцинів, тощо) (табл. 3.8):

Таблиця 3.8 – Варіанти розвитку ідеї стартапу

Варіант	Стислий опис можливого розвитку
1	2
Оптимістичний	розробка комбінованого препарату на основі бактеріоцинів з розширеним спектром дії на бактерії різних груп.
Реалістичний	розширення продуктового портфелю компанії (у тому числі за рахунок менш інноваційних продуктів: наприклад, білкові добавки, ферментні препарати).

Продовження таблиці 3.8

1	2
Песимістичний	технологія виробництва продається компанії, що спеціалізується на виготовленні добавок до кормів.

3.4 Визначення потенційних споживачів

Класифікація потенційних споживачів наведена у табл. 3.9:

Таблиця 3.9 – Класифікація потенційних споживачів

Юридична особа	
Критерій	Значення
1	2
1. Форма власності (державне, приватне, колективне, комунальне, змішане,...)	• Приватна: ферми, дистриб'ютори ветеринарних препаратів.
2. КВЕД	КВЕД 01.41: Розведення великої рогатої худоби молочних порід; КВЕД 01.42: Розведення іншої великої рогатої худоби та буйволів; КВЕД 01.43: Розведення коней та інших тварин родини конячих КВЕД 01.45: Розведення овець і кіз КВЕД 01.46: Розведення свиней КВЕД 01.47: Розведення свійської птиці КВЕД 01.49: Розведення інших тварин КВЕД 46.11: Діяльність посередників у торгівлі сільськогосподарською сировиною, живими тваринами, текстильною сировиною та напівфабрикатами КВЕД 46.21: Оптова торгівля зерном, необробленим тютюном, насінням і кормами для тварин КВЕД 46.23: Оптова торгівля живими тваринами КВЕД 46.24: Оптова торгівля шкірсировиною, шкурами та шкірою КВЕД 98.10: Діяльність домашніх господарств як виробників товарів для власного споживання
3. За потужністю (малі, середні, великі)	Малі, середні
4. За масштабом виробництва (одиничні, серійні, масові)	Масові, серійні

Продовження таблиці 3.9

1	2
5. За рівнем спеціалізації (вузькопрофільні, багатoproфільні, комбіновані)	Вузькопрофільні, багатoproфільні
6. За ресурсами, що споживаються (працемістки, матеріаломістки, капіталомістки, інформація)	Працемістки, капіталомістки
7. За чисельністю персоналу (малі, середні, великі)	Малі, середні
8. За сферою діяльності (виробничі, комерційні, фінансові, посередницькі, страхові...)	Виробничі, посередницькі
9. За приналежністю капіталу і контролю (національні, іноземні, спільні багатонаціональні,...)	Національні, іноземні, спільні багатонаціональні
10. За географічним розташуванням	Розташовані в Україні, країнах Європейського союзу
11. За віддаленістю органів управління (національні, міжнародні, офшорні, транснаціональні,...)	Національні, міжнародні
12. За характером господарської діяльності (промислові, сільськогосподарські, транспортні, будівельні, фінансово-кредитні, страхові, туристичні, консалтингові,...),	Сільськогосподарські, дистриб'юторська
13. За рівнем технологічної цілісності (провідні, дочірні, філії,...)	Провідні, дочірні, філії
14. За долею іноземного капіталу (з іноземними інвестиціями (більше 10 %), іноземне підприємство (100 %)).	З іноземними інвестиціями, іноземне підприємство
15. За формуванням статутного капіталу (унітарні, корпоративні)	Унітарні, корпоративні
16. За організацією виробничих процесів (періодичні, безперервні)	Безперервні, періодичні
17. За роботою протягом року (сезонні, позасезонні)	Сезонні, позасезонні
18. За географічним розташуванням на території України	Усі області України
19. За наявністю вільних ОБЗ (коштів)	Наявні
20. За динамікою розвитку регіону розташування юридичної особи: • Регіон • Чисельність населення • Динаміка росту регіону • Структура регіону • Правові обмеження торгівлі	• усі регіони України; • чисельність населення: від 1 тис. жителів (середні та великі села), від 50 тис. жителів (міста); • динаміка росту регіону: активний розвиток сільського господарства (тваринництва), розвиток транспортної, енергетичної інфраструктури;

Кінець таблиці 3.9

1	2
20. За динамікою розвитку регіону розташування юридичної особи: • Регіон • Чисельність населення • Динаміка росту регіону • Структура регіону • Правові обмеження торгівлі	• структура регіону: наявність виробничого господарського комплексу (сільське господарство); • Правові обмеження торгівлі: відсутні.

Для дослідження потреб споживачів було використано такий метод збору інформації як спостереження. Відповідно до цього було сформовано групи з трьох потенційних клієнтів за потребами, які закриває наш стартап (табл. 3.10):

Таблиця 3.10 – Основні групи потенційних споживачів і їх потреби

Категорія (група) клієнтів	Потреби, які він задовольняє за допомогою Вашого продукту
1	2
1. Приватна форма власності (фермерські господарства)	- зниження витрат на лікування тварин від ешерихіозів за рахунок профілактичних заходів; - забезпечення збалансованого годування тварин.
2. Приватна форма власності (дистриб'ютори товарів для ветеринарії)	- розширення продуктового портфеля компанії.
Відкоригована ідея стартап проєкту	
Виробництво кормових добавок з антибактеріальною активністю та високим вмістом біоактивних речовин та білка.	

Для зручності розрахунків потреби у продукти приймаємо, що процес вирощування бройлерів є безперервним і при послідовному вирощуванні курей таких циклів може бути 9 (мінімальна потреба в кормі). Таким чином, за рік при утриманні 700 голів бройлерів необхідно 33 390 кг корму (малі підприємства), а 2 000 голів – 95 400 кг корму (середні підприємства). Для яєчних порід для 700 голів на рік необхідно мінімум 6 500 кг корму на рік (19 600 кг протягом життя), для 2 000 голів – 18 700 кг корму на рік (56 000 кг

корму протягом життя). Таким чином для малої птахоферми приймаємо мінімальну потребу в кормі у 19 600-33 390 кг корму, для середньої – 18 700-95 400 кг корму. При витраті препарату у 10 % від обсягу корму, потреба у коліцині становить 1 960-3 339 кг, для середньої – 1 870-9 540 кг.

Мінімальна потреба корму для малої свиноферми з кількістю голів близько 200 становить 9 600 кг корму, для середньої ферми – 28 000 кг. Таким чином, потреба у коліцині для малих свиноферм становить 960 кг, а для середніх – 2 800 кг.

Для отримання біомаси продуценту близько 10 000 кг необхідна площа 468 м² (при вегетативному періоді у 124 дні). При круглорічному вирощуванні теоретично на цій площі можна отримати до 29 000 кг свіжої біомаси. Приймаємо втрати у 10 % та вважаємо, що у оптимальних умовах отримаємо 26 000 кг біомаси за 1 рік вегетації [64].

Паспорти клієнтів наведені у табл. 3.11 та 3.12.

Таблиця 3.11 – Паспорт потенційного клієнта (фермерські господарства)

Характеристика	Значення
1	2
Організаційно-правова форма	Приватна
Класифікація -за обсягом -за сезонністю виробництва -за типом худоби - за спеціалізацією - спосіб утримання тварин	- малі, середні; - не залежать від сезону; - тваринницькі, птахівницькі; - племенні, репродуктивні, товарні; - прив'язний, безприв'язний, комбінований.
Розташування (місто, село)	Село
Вид продукту, який потрібен даному споживачеві	Добавка, що пригнічує розвиток патогенних мікроорганізмів у кормі
Призначення придбаної розробки -за призначенням -інше	За призначенням: профілактика бактеріального забруднення кормів для тварин
Кваліфікація персоналу підприємства -робочі -службовці -керівники	Робочі, керівники
Потенційний обсяг споживання розробки	від 1960-3339 кг для малої птахоферми; від 1870-9540 кг для середньої птахоферми; від 960 кг для малої свиноферми;

Продовження таблиці 3.11

1	2
Потенційний обсяг споживання розробки	від 2800 кг для середньої свиноферми.
Хто приймає рішення про придбання розробки (узагальнена характеристика працівника)	• освіта: вища; • фінансове положення: вище середнього; • вік: від 20 до 60 років; • основні цінності: зацікавлені у інноваційних продуктах та технологіях, • особливості поведінки: раціональні, прагматичні, рішення ґрунтуються на фінансових розрахунках, мають критичне мислення.

Таблиця 3.12 – Паспорт потенційного клієнта (дистриб'ютори)

Характеристика	Значення
1	2
Організаційно-правова форма	Приватна
Класифікація - за обсягом - за типами товарів - за видами тварин - за географією	- малі, середні; - не залежать від сезону; - комбікорма, вітамінно-білкові добавки, підкислювачі, ветеринарні препарати; - свині, ВРХ, птахи; - усі регіони України
Розташування (місто, село)	Місто
Вид продукту, який потрібен даному споживачеві	Добавка, що пригнічує розвиток патогенних мікроорганізмів у кормі (більш ефективний аналог підкислювачів)
Призначення придбаної розробки - за призначенням - інше	За призначенням: розширення продуктового портфелю.
Потенційний обсяг споживання розробки	договірний
Хто приймає рішення про придбання розробки (узагальнена характеристика працівника)	• освіта: вища; • фінансове положення: вище середнього; • вік: від 20 до 60 років; • основні цінності: зацікавлені у інноваційних продуктах та технологіях, • особливості поведінки: раціональні, прагматичні, рішення ґрунтуються на фінансових розрахунках, мають критичне мислення.

Приймаємо, що плановий обсяг споживання розробки складає 10 000 кг/рік. Відповідно, плануємо обсяг виготовлення продукції по місяцях. Враховуємо, що продуктивність кале за 1 рік при площі 468 м² становить 26 000 кг/рік (табл. 3.13).

Таблиця 3.13 – Запланований обсяг реалізації стартап проєкту (товарів, послуг)

	Січень 2026	Лютий 2026	Березень 2026	Квітень 2026	Травень 2026	Червень 2026	Липень 2026	Серпень 2026	Вересень 2026	Жовтень 2026	Листопад 2026	Грудень 2026
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Запланований обсяг, кг/міс	2167	2167	2167	2167	2167	2167	2167	2167	2167	2167	2167	2167

Таким чином, 50 % від очікуваного навантаження виробництва (потреба споживача 5000 кг/рік) забезпечується за 2,4 місяця, а 100 % від очікуваного навантаження виробництва – за 4,6 місяця.

3.5 Ціна інноваційної пропозиції на ринку

Визначені проєктні ціни продажу ідеї наведені у табл. 3.14:

Таблиця 3.14 – Проєктні ціни продажу ідеї, технології, методики, програми

Найменування товару	Планові обсяги продажу		Прототип (Екстракт танінів, отриманого з каштану, <i>Silvafeed</i>)	
	Кількість, од/рік	Ціна, грн/од	Кількість, од/рік	Ціна, грн/од
1	2	3	4	5
Коліцин М з <i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>	26000 кг/рік	850 грн/кг	2 000 000 кг/рік	410 грн/кг

Ціну інноваційного продукту визначаємо за витратним, агрегатним, параметричним методами та аналізом точки беззбитковості.

3.5.1 Визначення ціни на основі аналізу точки беззбитковості

За аналізом точки беззбитковості прибуток дорівнює різниці між ціною та собівартістю. При нульовому прибутку, таким чином, ціна є собівартістю. Розрахунок річної ціни ($C_{\text{рік}}$) проводимо за формулою 3.1:

$$C_{\text{рік}} = A + \text{ОбЗ}, \quad (3.1)$$

де A – амортизація, ОбЗ – вартість оборотних засобів.

Ціна одиниці ($C_{\text{од}}$) розраховується за формулою 3.2:

$$C_{\text{од}} = \frac{C_{\text{рік}}}{B_{\text{рік}}}, \quad (3.2)$$

де $C_{\text{рік}}$ – річна ціна, $B_{\text{рік}}$ – обсяг річного виробництва.

Амортизаційні відрахування (A) розраховуються за формулою 3.3:

$$A = \frac{\text{ОФ}}{\text{роки експлуатації}}, \quad (3.3)$$

де ОФ – вартість основних фондів (обладнання).

$$A = \frac{1\,444\,179 \text{ грн}}{10 \text{ років}} = 144\,417,9 \text{ грн/рік} \quad (3.3)$$

$$\begin{aligned} C_{\text{рік}} &= 144\,417,9 \text{ грн/рік} + 10173524,7 \text{ грн} \\ &= 10317942,60 \text{ грн/рік} \end{aligned} \quad (3.1)$$

$$C_{\text{од}} = \frac{9417942,60 \text{ грн/рік}}{26\,000 \text{ кг/рік}} = 396,84 \text{ грн/кг} \quad (3.2)$$

На основі розрахунків сформовано графік точки беззбитковості (рис. 3.2).

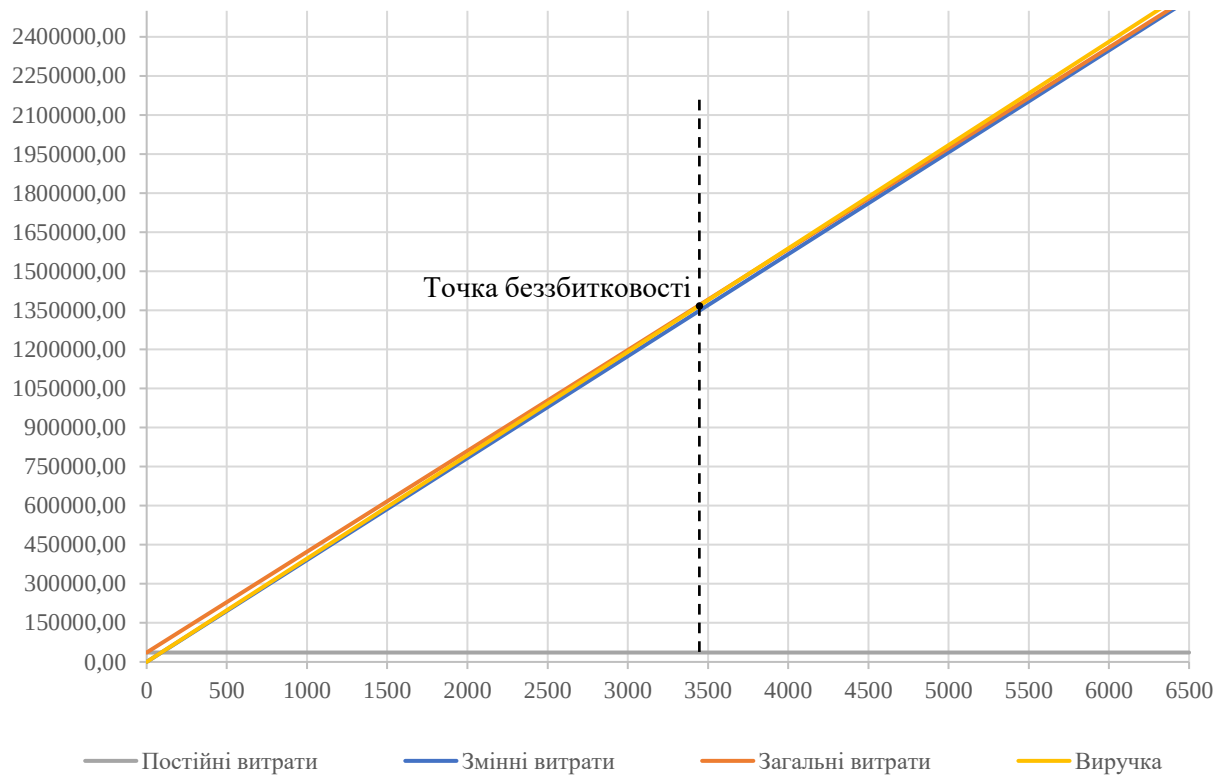


Рисунок 3.2 – Графік точки беззбитковості

3.5.2 Визначення ціни витратним методом

Визначення ціни витратним методом ($C_{\text{рік}}$) здійснювалось за формулою 3.4:

$$C_{\text{рік}} = 1,05 * C, \quad (3.4)$$

де 1,05 – коефіцієнт прибутку, C – собівартість.

$$C_{\text{рік}} = 1,05 * 10\,317\,942,60 \text{ грн} = 10\,833\,839,73 \text{ грн/рік} \quad (3.4)$$

Ціна одиниці витратним методом ($C_{\text{од}}$) розраховується за формулою 3.2.

$$C_{\text{од}} = \frac{10\,833\,839,73 \text{ грн/рік}}{26\,000 \text{ кг/рік}} = 416,69 \text{ грн/кг} \quad (3.2)$$

3.5.3 Визначення ціни агрегатним методом

Визначення ціни агрегатним методом ($C_{\text{рік}}$) здійснюється за формулою 3.5:

$$C_{\text{рік}} = C_c + C_k + C_o + C_p, \quad (3.4)$$

де C_c – ціна сировини та матеріалів, C_k – ціна комунальних послуг, C_o – ціна оренди виробничого приміщення, C_p – ціна роботи.

$$C_{\text{рік}} = 1\,476\,032 \text{ грн/рік} + 1\,952\,321,5 \text{ грн/рік} + 900\,000 \text{ грн/рік} + 7\,173\,600 \text{ грн/рік} = 10\,173\,524,7 \text{ грн/рік} \quad (3.4)$$

Ціна одиниці агрегатним методом ($C_{\text{од}}$) розраховується за формулою 3.2.

$$C_{\text{од}} = \frac{10\,173\,524,7 \text{ грн/рік}}{26\,000 \text{ кг/рік}} = 391,29 \text{ грн/кг} \quad (3.2)$$

3.5.4 Визначення ціни параметричним методом

Визначення ціни параметричним методом ($C_{\text{нovoї моделі}}$) здійснюється за формулою 3.5:

$$C_{\text{нovoї моделі}} = C_{\text{базової моделі}} * \frac{\text{Балова оцінка нової моделі}}{\text{Балова оцінка базової моделі}}, \quad (3.5)$$

$C_{\text{нovoї моделі}}$ – ціна ідеї, технології, розробки, за якою автор пропонуватиме її на ринку, $C_{\text{базової моделі}}$ – ціна прототипу, аналогу, які вже існують на ринку.

Визначення параметрів для параметричного методу ціноутворення наведені у табл. 3.15:

Таблиця 3.15 – Параметри для параметричного методу ціноутворення

Позначення	Найменування
1	2
1	Стабільність препарату
2	Специфічність
3	Спектр антибактеріальної активності

Оцінка нового продукту та прототипу за параметрами наведена у табл. 3.16:

Таблиця 3.16 – Параметричний метод ціноутворення

Продукт	Параметри						Балова оцінка
	1		2		3		
	бали	коефіцієнт вагомості	бали	коефіцієнт вагомості	бали	коефіцієнт вагомості	
1	2	3	4	5	6	7	8
Новий (Коліцин М з <i>B. oleraceae</i> var. <i>acephala</i>)	80	0,35	100	0,3	50	0,35	75,5
Прототип (Екстракт танінів, отриманих з каштану, Silvafeed)	80	0,35	40	0,3	75	0,35	66,25

Оцінка одного балу розраховується за формулою 3.6:

$$Ц_{\text{бал}} = \frac{Ц_{\text{базової моделі}}}{\text{Балова оцінка базової моделі}} \quad (3.6)$$

$$Ц_{\text{бал}} = \frac{410}{80 * 0,35 + 40 * 0,3 + 75 * 0,35} = 6,19 \quad (3.6)$$

Таким чином, ціна нової моделі за формулою 3.5 дорівнює:

$$Ц_{\text{нової моделі}} = 410 * \frac{75,5}{66,25} = 467,25 \text{ грн/од} \quad (3.5)$$

3.5.5 Визначення ціни конкурентним методом

Конкурентами на ринку виробництва кормових добавок з антимікробною дією є підкислювачі. Серед проаналізованих конкурентів ціна за 1 кг підкислювачів не перевищує 276,17 грн за 1 дм³ або 1 кг. Проте, оскільки наша добавка окрім антибактеріальної дії збагачує корм білком та біоактивними компонентами, вища ціна продукту може бути виправдана і буде врахована при розробці маркетингової стратегії.

На ринку виробництва антибактеріальних сполук для застосування у ветеринарії, є рослинні екстракти з високим вмістом вторинних метаболітів, що проявляють антибактеріальну активність. Прототипом було обрано екстракт танінів, отриманих з каштану (Silvafeed). Оскільки таніни здатні змінювати органолептичні властивості корму та не мають харчової цінності, коліцин, отриманий із капусти, у цьому аспекті має очевидні переваги.

3.5.6 Техніко-економічні показники стартапу

Калькуляція собівартості стартап проєкту викладена у таблиці 3.17.

Таблиця 3.17 – Калькуляція собівартості стартап проєкту

№ п/п	Етап розробки / елемент собівартості	Кількісний показник	Вартісний показник
1	2	3	4
1	Аналіз ринку та етап розробки ідеї		
	заробітна плата і нарахування (ЄСВ)	2 особи	91500 грн (з них 16500 грн - ЄСВ)
2	Підготовка запуску виробництва		
	закупівля обладнання	41 од	1213368 грн
	амортизація	6 місяців	728020,8 грн
	закупівля сировини та матеріалів	22 одиниці	110830,65 грн
	заробітна плата і нарахування (ЄСВ)	8 осіб	2196000 грн (з них 396000 грн - ЄСВ)
	електроенергія, паливо	10 МВт год, 100 м ³	10304,3 грн
	водопостачання, водовідведення	9000 м ³	427680 грн
	оренда	6 місяців	450000 грн
	косметичний ремонт	20 % річної вартості оренди	180000 грн
3	Етап впровадження (пілотне виробництво)		
	закупівля обладнання	10 од	230811 грн
	амортизація	3 місяці	69243,3 грн
	закупівля сировини та матеріалів	13 од	36772,55 грн
	заробітна плата і нарахування (ЄСВ)	9 осіб	1262700 грн (з них 227700 грн - ЄСВ)
	електроенергія, паливо	15 МВт год, 200 м ³	17177,45 грн
	водопостачання, водовідведення	15000 м ³	712800 грн
4	Етап масової реалізації		
	заробітна плата і нарахування (ЄСВ)	13 осіб	1195600 грн (з них 215600 грн - ЄСВ)

Продовження таблиці 3.17

1	2	3	4
4	електроенергія, паливо	25 МВт год, 200 м ³	24039,75 грн
	водопостачання, водовідведення	16000 м ³	760320 грн
	оренда	2 місяці	150000 грн

Перелік основних засобів, необхідних для забезпечення виробництва, наведений у таблиці 3.18.

Таблиця 3.18 – Забезпеченість проєкту основними засобами

Місце ОЗ у технологічному процесі	Назва ОЗ	Повна початкова вартість ОЗ, грн	Плановий період експлуатації ОЗ, у роках	Очікуваний постачальник	Джерело фінансування придбання
1	2	3	4	5	6
Всі технологічні процеси	Приміщення	75000 грн/міс	10	Орендодавець	Власні кошти, гранти, кредити вітчизняних та іноземних установ
Адміністративні процеси	Стіл комп'ютерний (x7)	1500 грн/од	10	ТОВ «Епіцентр К»	
Адміністративні процеси	Стілець офісний (x7)	1410 грн/од	10	ТОВ «Епіцентр К»	
Адміністративні процеси	Ноутбук (x7)	27000 грн/од	10	ТОВ «Епіцентр К»	
Адміністративні процеси	Принтер HP LaserJet M211d A4 (x2)	7139 грн/од	10	ТОВ «Епіцентр К»	
Виробниче культивування	Стелажі для теплиці хромовані (x2)	3800 грн/од	10	ТОВ «Епіцентр К»	
Виробниче культивування	Фітолампи (x4)	1187,5 грн/од	10	ТОВ «Епіцентр К»	
Всі технологічні процеси	Стіл лабораторний	23000 грн/од	10	ТОВ «ХІМТЕСТ УКРАЇНА +»	
Всі технологічні процеси	Стілець лабораторний	3600 грн/од	10	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
Всі технологічні процеси	Шафа для технологічного одягу	8000 грн/од	10	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	

Продовження таблиці 3.18

1	2	3	4	5	6
Всі технологічні процеси	Шафа для зберігання реактивів	15000 грн/од	10	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	Власні кошти, гранти, кредити вітчизняних та іноземних установ
Контроль якості, науково-дослідні роботи	Шафа витяжна демонстраційна	64027 грн/од	10	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
Підготовка води очищеної	Електричний аквадистилятор D4	14980 грн/од	10	ТОВ «УКРАНАЛІТИКА»	
Контроль якості, науково-дослідні роботи	Камера для горизонтального електрофорезу MultiSUB Mini	12876 грн/од	10	ТОВ «ХІМТЕСТ УКРАЇНА +»	
Контроль якості, науково-дослідні роботи	Спектрофотометр ULAB 101	58729 грн/од	10	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
Контроль якості, науково-дослідні роботи	Центрифуга лабораторна з охолодженням 5702 R G	489900 грн/од	10	ТОВ «ХІМТЕСТ УКРАЇНА +»	Власні кошти, гранти, кредити вітчизняних та іноземних установ
Науково-дослідні роботи	Водяна баня БВ-4	6270 грн/од	10	ТОВ «УКРАНАЛІТИКА»	
Підготовка виробничого процесу	Стерилізатор паровий M0-ST-VU	114186 грн/од	10	ТОВ «УКРАНАЛІТИКА»	
Виробниче культивування	Термостат сухоповітряний TC-20	24900 грн/од	10	ТОВ НВП «МІКРОМЕД»	
Контроль якості, науково-дослідні роботи	Орбітальний шейкер S-3 MICROmed	14300 грн/од	10	ТОВ «ХІМТЕСТ УКРАЇНА +»	
Зберігання термолабільних речовин	Холодильник Grunhelm VRH-S85M48-W	5000 грн/од	10	ТОВ «Епіцентр К»	

Продовження таблиці 3.18

1	2	3	4	5	6
Зберігання бактеріальних культур	Низькотемпературний морозильник RF-86L28	143258 грн/од	10	ТОВ «ВСК» ФРОСТЛЕНД»	Власні кошти (створення фонду розвитку виробництва)
Контроль якості, науково-дослідні роботи	Мікроскоп біологічний XS-2610 LED	8950 грн/од	10	ТОВ НВП «МІКРОМЕД»	Власні кошти, гранти, кредити вітчизняних та іноземних установ
Науково-дослідні роботи	Ультразвукова баня WUC-A01H Daihan	13000 грн/од	10	ТОВ «ХІМТЕСТ УКРАЇНА +»	
Контроль якості, науково-дослідні роботи	Магнітна мішалка з підігрівом та датчиком MM-5	5700 грн/од	10	ТОВ НВП «МІКРОМЕД»	
Контроль якості, науково-дослідні роботи	pH-метр pH-150MI	7680 грн/од	10	ПП «СИСТЕМА ОПТИМУМ»	
Контроль якості, науково-дослідні роботи	Лабораторні ваги TBE-0,3-0,01-a	7170 грн/од	10	ТОВ НВП «МІКРОМЕД»	
Контроль якості, науково-дослідні роботи	Аналітичні ваги AS 220.R2	53953 грн/од	10	ТОВ «ХІМТЕСТ УКРАЇНА +»	
Всі технологічні процеси	Ламінарний бокс БМУФ-01.070	70000 грн/од	10	ТОВ «ХІМТЕСТ УКРАЇНА +»	
Всі технологічні процеси	Піпет-дозатори Thermo Scientific на 100-1000, 1000-5000 мм ³ , восьмиканальний дозатор на 300 мм ³	21822 грн/од	10	ТОВ НВП «МІКРОМЕД»	
Всі технологічні процеси	Генератор комбінований Konner&Sohnen 2,5 кВт	18000 грн/од	10	ТОВ «Епіцентр К»	Власні кошти та бюджетні інвестиції (місцеві)

Продовження таблиці 3.18

1	2	3	4	5	6
Всі технологічні процеси	Джерело безперебійного живлення Ritar RTSW-600	3880 грн/од	10	ТОВ «Епіцентр К»	бюджети, гранти)

При врахуванні потреб у реактивах приймаємо, що річна потреба у середовищі становить 7,5 дм³, що достатньо для підтримання продуценту у культурі *in vitro*. Забезпеченість стартапу оборотними фондами наведена у таблиці 3.19.

Таблиця 3.19 – Забезпеченість проєкту оборотними фондами

Група ОбФ	Назва	Норма витрат на рік, грн/од	Ціна, грн	Очікуваний постачальник	Джерело фінансування придбання
1	2	3	4	5	6
Сировина					
Сировина і матеріали	Амонію нітрат; Cas-номер: 6484-52-2 (хч)	0,1 кг	98,4 грн/0,1 кг	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	Власні кошти, гранти, кредити вітчизняних та іноземних установ
	Кальцію хлорид дигідрат; Cas-номер: 10035-04-8 (хч)	0,1 кг	76,8 грн/0,1 кг	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Магнію сульфат гептагидрат; Cas-номер: 10034-99-8 (хч)	0,1 кг	19,8 грн/0,1 кг	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Калію фосфат однозаміщений; Cas-номер: 7778-77-0 (хч)	0,1 кг	30 грн/0,1 кг	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Калію нітрат; Cas-номер: 7757-79-1 (хч)	0,1 кг	72 грн/0,1 кг	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Борна кислота; Cas-номер: 10043-35-3 (хч)	0,1 кг	59,52 грн/0,1 кг	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	

Продовження таблиці 3.19

1	2	3	4	5	6
	Кобальту хлорид гексагідрат; Cas- номер: 7791-13-1 (чда)	0,1 кг	228 грн/0,1 кг	ТОВ «ХІМЛА- БОРРЕАКТИВ»	
	Міді (II) сульфат пентагідрат; Cas- номер: 7758-99-8 (ч)	0,1 кг	17,9 грн/0,1 кг	ПП «СИСТЕМА ОПТИМУМ»	
	Марганцю (II) сульфат пентагідрат; Cas-номер: 13465- 27-5 (ч)	0,1 кг	19,8 грн/0,1 кг	ТОВ «ХІМЛА- БОРРЕАКТИВ»	
	Калію йодид; Cas- номер: 7681-11-0 (хч)	0,1 кг	45,0 грн/0,1 кг	ТОВ «ХІМЛА- БОРРЕАКТИВ»	
	Натрію молібдат дигідрат; Cas- номер: 10102-40-6 (чда)	0,1 кг	206 грн/0,1 кг	ТОВ «ХІМЛА- БОРРЕАКТИВ»	
	Цинку сульфат гептагідрат; Cas- номер: 7446-20-0 (хч)	0,1 кг	5,04 грн/0,1 кг	ПП «СИСТЕМА ОПТИМУМ»	
	Натрію фередетат; Cas-номер: 15708- 41-5 (ч)	0,1 кг	29,2 грн/0,1 кг	ТОВ «ХІМЛА- БОРРЕАКТИВ»	
	Міо-інозитол; Cas- номер: 87-89-8	0,05 кг	5075 грн/0,05 кг	ТОВ «ХІМЛА- БОРРЕАКТИВ»	
	Нікотинова кислота; Cas- номер: 59-67-6	0,05 кг	30 грн/0,05 кг	ТОВ «ХІМЛА- БОРРЕАКТИВ»	
	Пиридоксин гідрохлорид; Cas- номер: 58-56-0	0,05 кг	210 грн/0,1 кг	ТОВ «ХІМЛА- БОРРЕАКТИВ»	
	Тіамін гідрохлорид; Cas-номер: 67-03-8	0,05 кг	240 грн/0,1 кг	ТОВ «ХІМЛА- БОРРЕАКТИВ»	
	Гліцин; Cas-номер: 56-40-6	0,05 кг	29 грн/0,1 кг	ТОВ «ХІМЛА- БОРРЕАКТИВ»	
	Бульон Лурія	0,5 кг	2866,81 грн/0,5 кг	ТОВ «ХІМЛА- БОРРЕАКТИВ»	
	Агар-агар мікробіологічний	0,25 кг	625 грн/0,25 кг	ТОВ «ХІМЛА- БОРРЕАКТИВ»	
	Акриламід; Cas- номер: 79-06-1	0,1 кг	2 706 грн/0,1 кг	ТОВ «ХІМЛА- БОРРЕАКТИВ»	

Продовження таблиці 3.19

1	2	3	4	5	6
	Тріс-гідрохлорид (рН 8.8); Cas-номер: 1185-53-1	2 дм ³	3748 грн/1 дм ³	ТОВ «АЛТ УКРАЇНА ЛТД»	
	Тріс-гідрохлорид (рН 6.8); Cas-номер: 1185-53-1	2 дм ³	3904 грн/1 дм ³	ТОВ «АЛТ УКРАЇНА ЛТД»	
	Натрію додецил сульфат; Cas-номер: 151-21-3 (чда)	0,1 кг	64,8 грн/0,1 кг	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Амонію персульфат; Cas-номер: 7727-54-0 (ч)	0,1 кг	75 грн/1 кг	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	N, N, N', N'-тетраметілендіамін; Cas-номер: 110-18-9 (чда)	0,1 дм ³	4 253 грн/0,1 дм ³	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Кумасі діамантовий блакитний G250; Cas-номер: 6104-58-1 (чда)	0,025 кг	5 158 грн/0,025 кг	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Натрію хлорид; Cas-номер: 7647-14-5 (хч)	1 кг	108 грн/1 кг	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Калію хлорид; Cas-номер: 7447-40-7 (хч)	0,1 кг	76,8 грн/0,1 кг	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Натрію фосфат двозаміщений; Cas-номер: 7558-79-4 (ч)	0,1 кг	36 грн/0,1 кг	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Бичачий сироватковий альбумін; Cas-номер: 9048-46-8	0,01 кг	6 243 грн/0,01 кг	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Ортофосфорна кислота 85 % (харчова); Cas-номер: 7664-38-2	1,8 дм ³	356 грн/1,8 дм ³	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Етанол 96 % технічний; Cas-номер: 64-17-5	10 дм ³	450 грн/5 дм ³	ТОВ «МЕНДЕЛЄВ МАРКЕТ»	

Продовження таблиці 3.19

1	2	3	4	5	6
	Штам Agrobacterium tumefaciens LBA4404 (хімічно компетентні)	1 амп	34000 грн/амп	Gold Biotechnology®, Inc	
	Штам Escherichia coli NCTC 7928	1 амп	18000 грн/амп	Culture Collections UK Health Security Agency	
	Матеріали				
	Чашки Петрі	100 шт	61,36 грн/шт	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	Власні кошти, гранти, кредити вітчизняних та іноземних установ
	Колба конічна Ерленмеєра Simax (50 см³)	2 шт	224,5 грн/шт	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Колба конічна Ерленмеєра Simax (250 см³)	2 шт	70,5 грн/шт	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Колба конічна Ерленмеєра Simax (500 см³)	2 шт	151 грн/шт	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Мірний стакан з градуванням Labexpert (25 см³)	2 шт	25,2 грн/шт	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Мірний стакан з градуванням Labexpert (1 дм³)	1 шт	161,28 грн/шт	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Мірний циліндр Labexpert (10 см³)	2 шт	50,4 грн/шт	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Мірний циліндр Labexpert (50 см³)	2 шт	75,6 грн/шт	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Мірний циліндр Labexpert (250 см³)	2 шт	176,4 грн/шт	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Воронка скляна	2 шт	144,42 грн/шт	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Бутель для реагентів Simax світле скло (50 см³)	3 шт	221,73 грн/шт	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Бутель для реагентів Simax темне скло (500 см³)	1 шт	1572,61 грн/шт	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Бутель для реагентів Simax світле скло (1 дм³)	5 шт	562,82 грн/шт	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Бутель для реагентів Simax світле скло (2 дм³)	5 шт	604,35 грн/шт	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	

Продовження таблиці 3.19

1	2	3	4	5	6
	Порцелянова ступка (500 см ³)	2 шт	176,4 грн/шт	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Порцеляновий пест	2 шт	233 грн/шт	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Пінцет анатомічний з нержавіючої сталі	20 шт	143 грн/шт	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Ножичі прямі з нержавіючої сталі	20 шт	150 грн/шт	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Шпатель-ложка з нержавіючої сталі	5 шт	31,5 грн/шт	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Магніти для перемішування	5 шт	173 грн/шт	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Мікробіологічна петля ніхромована	10 шт	11,56 грн/шт	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Центрифужні пробірки стерильні Greiner (15 см ³)	50 шт	34514 грн/1000 шт	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Мікропробірки стерильні Eppendorf (1,5 см ³)	500 шт	504 грн/250 шт	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Фільтрувальний папір 600x600 мм	5 кг	5564 грн/10 кг	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Наконечники для дозаторів 300 мм стерильні	1000 шт	686,26 грн/1000 шт	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Наконечники для дозаторів 100-1000 мм ³ стерильні	1000 шт	150 грн/500 шт	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Наконечники для дозаторів 1000-5000 мм ³ стерильні	500 шт	850,5 грн/300 шт	ТОВ НВП «МІКРОМЕД»	
	Штативи для наконечників 300 мм ³	15 шт	87,64 грн/шт	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Штативи для наконечників 1000 мм ³	10 шт	87,64 грн/шт	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Планшети 96-лункові плоскодонний	100 шт	1877 грн/50 шт	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Дезінфікуючий розчин	5 дм ³	5388 грн/5 дм ³	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Інвентар для прибирання	1 шт	500 грн/шт	ТОВ «Епіцентр К»	
	Нітрилові рукавички	12 уп	177 грн/уп	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	
	Окуляри хімічні	2 шт	28 грн/шт	ТОВ «ХІМЛА-БОРРЕАКТИВ»	

Продовження таблиці 3.19

1	2	3	4	5	6
	Газовий балон (50 м ³)	1 шт	4690 грн/шт	ТОВ «Епіцентр К»	
Паливо, електроенергія	Електроенергія	50 МВт год	686,23 грн/МВт год	ПрАТ «ДТЕК Київські регіональні електромережі»	Власні кошти, гранти, кредити вітчизняних та іноземних установ
	Газ автомобільний	500 м ³	34,42 грн/м ³	АЗС Києва та Київської області	
Водопостачання та водовідведення	Водопостачання	40000 м ³	27,17 грн/м ³	ПрАТ АК Київводоканал	Власні кошти, гранти, кредити вітчизняних та іноземних установ
	Водовідведення	40000 м ³	20,35 грн/м ³	ПрАТ АК Київводоканал	

Забезпеченість старту трудовими ресурсами наведена у табл. 3.20.

Таблиця 3.20 – Забезпеченість проєкту трудовими ресурсами

Категорія кадрів	Назва посади	Чисельність за списком на посаді	Кваліфікаційні вимоги	Плановий рівень зарплатної	Джерело фінансування ФОП
1	2	3	4	5	6
Робочі допоміжні	Слюсар	1	-	20000	Власні кошти, гранти, кредити вітчизняних та іноземних установ
	Комірник	1	-	20000	
Спеціалісти	Біотехнолог	2	Вища фахова освіта (магістр)	45000	
	Хімік	1	Вища фахова освіта (магістр)	45000	
	Менеджер з систем контролю якості	1	Вища фахова освіта (магістр)	40000	
	Бухгалтер	1	Вища фахова освіта (бакалавр)	35000	
	Менеджер з продажів	1	Вища фахова освіта (бакалавр)	30000	

Продовження таблиці 3.20

1	2	3	4	5	6
	Маркетолог	1	Вища фахова освіта (бакалавр)	30000	
Молодший персонал обслуговування	Лаборант	2	Спеціальна технічна освіта	20000	
Керівники	Генеральний директор	1	Вища фахова освіта (магістр)	80000	
	Заступник генерального директора	1	Вища фахова освіта (магістр)	60000	
Всього		Робітників	13		
		Заробітна плата, грн/міс	490000		
		ЄСВ, грн/міс	107800		

Техніко-економічні показники проєкту наведені у табл. 3.21.

Таблиця 3.21 – Техніко-економічні показники проєкту

Показники	Одиниці виміру	Умовне позначення, формула розрахунку	Значення
1	2	3	4
1. Річний обсяг реалізації ідеї, технології, методики	Од	В	26 000 кг
2. Середньорічна чисельність персоналу за списком - процес розробки - процес реалізації	Осіб	$Ч_{сп} = Ч_{яв} \times К_{пер}$	- процес розробки: 2,2 - процес реалізації: 14,3
3. у тому числі - основних - допоміжних - інженерно-технічного персоналу	Осіб	$Ч_{сп} = Ч_{яв} \times К_{пер}$	- основних: 7,7 - допоміжних: 4,4 - інженерно-технічного персоналу: 2,2
4. Середньорічний виробіток робітника:	Од/особу	$ППс.р. = В / Ч_{сп}$	1 818,18
5. Капіталовкладення у проєкт: - всього - на одиницю продукції	Грн Грн/од	$К = ОФ + ОБК$	-всього: 11617703,7 -на одиницю продукції: 446,83
6. Повна собівартість: - всього - на одиницю продукції	Грн Грн/од	$С = А + ОБК$	10317942,60 грн 396,8439462 грн/од

Продовження таблиці 3.21

1	2	3	4
7. Відносний прибуток	Грн/рік	$P = \frac{C}{S} - C$	11 782 057,40
8. Рентабельність на рік	%	$R = \left(\frac{P}{C} \right) \times 100$	114,19 %
9. Період повернення капіталовкладень	Років	$T_{пов} = K/P$	0,99 роки
10. Фондовіддача виробничих фондів	Грн/грн	$\Phi B = (C \times V) / OF$	15,3
11. Фондоємність	Грн/грн	$\Phi \epsilon = 1 / \Phi B$	0,065347466
12. Продуктивність праці	Грн/особу	$ПП = V / (C_{сп} \times T)$	0,963
13. Коефіцієнт економічної ефективності	-	$E = P/K$	1,01

3.6 Концепція бізнес-моделі проєкту та карта бізнес-процесів реалізації проєкту

Карта бізнес-процесів стартапу наведена у табл. 3.22:

Таблиця 3.22 – Карта бізнес-процесів виконання стартап проєкту

Стадія реалізації стартап проєкту	Бізнес-процеси	Характеристики		
		Задіяні ресурси	Орієнтовна тривалість процесу	Верхня межа фінансових витрат
1	2	3	4	5
Розробка ідеї стартапу	маркетинговий аналіз	Інтелектуальний, людський, фінансовий	15 днів	30000 грн
	формування комерційної пропозиції			
	патентний пошук	Інтелектуальний, людський, фінансовий		45000 грн
	розробка стартап проєкту	Інтелектуальний, людський	5 днів	
	пошук фінансування	Інтелектуальний, людський	10 днів	
Підготовка запуску виробництва	реєстрація підприємства	Інтелектуальний, людський, фінансовий	1 день	-
	пошук приміщення для оренди і заключення договору	Людський, фінансовий	10 днів	450000 грн
	облаштування виробничого приміщення	Людський, фінансовий	1 місяць	180000 грн
	закупівля обладнання, сировини та матеріалів	Людський, фінансовий	20 днів	2 052 219,45 грн
	відпрацювання технології	Інтелектуальний, людський, фінансовий	2 міс	437 984,3 грн

Продовження таблиці 3.22

1	2	3	4	5
	розробка та впровадження НТД	Інтелектуальний, людський	1 міс	2196000 грн
	підбір та навчання персоналу	Інтелектуальний, людський	1 міс	
Етап впровадження (пілотне виробництво)	закупівля обладнання, сировини та матеріалів	Людський, фінансовий	10 днів	336 826,85 грн
	інтеграція технології у виробничий процес	Інтелектуальний, людський	1 місяць	954 977,45
	валідація технології	Інтелектуальний, людський	2 місяці	1262700 грн
	підготовка документів до реєстрації продукту	Інтелектуальний, людський		
	підготовка виробництва до перевірки відповідності вимогам GMP	Інтелектуальний, людський, фінансовий		
Масова реалізація	вихід на планові виробничі потужності	Людський, фінансовий	1 місяць	934 359,75 грн
	маркетингова кампанія	Людський, фінансовий	1 місяць	1195600 грн
	налагодження логістики	Людський, фінансовий		
	розширення клієнтської бази	Людський, фінансовий		

Системний аналіз бізнес-процесів стартапу викладено у табл. 3.23:

Таблиця 3.23 – Системний аналіз бізнес-процесів стартапу

Функції	Елементи										
	Слюсар	Комірник	Біотехнолог	Хімік	Менеджер з систем контролю якості	Бухгалтер	Менеджер з продажів	Маркетолог	Лаборант	Генеральний директор	Заступник генерального директора
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
маркетинговий аналіз								+			

Продовження таблиці 3.23

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
формування комерційної пропозиції			+					+			
патентний пошук			+								
розробка стартап проєкту			+					+			
пошук фінансування			+					+			
реєстрація підприємства										+	
пошук приміщення для оренди і заключення договору			+					+		+	
облаштування виробничого приміщення	+		+						+		
закупівля обладнання, сировини та матеріалів			+							+	
відпрацювання технології	+		+		+				+		
розробка та впровадження НТД			+		+						
підбір та навчання персоналу			+		+					+	
закупівля обладнання, сировини та матеріалів			+								
інтеграція технології у виробничий процес	+		+	+	+				+		
валідація технології	+		+	+	+						
підготовка документів до реєстрації продукту			+	+	+						
підготовка виробництва до перевірки відповідності вимогам GMP	+		+	+	+				+		
вихід на планові виробничі потужності	+		+	+	+				+		
маркетингова кампанія							+	+		+	+
налагодження логістики		+								+	+
розширення клієнтської бази		+					+	+		+	+

3.7 Ризики стартап проєкту та методи управління ними

Резюме ризиків інноваційної розробки наведено у табл. 3.24:

Таблиця 3.24 – Ризики інноваційної розробки

Стадія реалізації стартап проєкту	Бізнес-процеси	Зовнішні ризики	Внутрішні ризики
1	2	3	4
Розробка ідеї стартапу	маркетинговий аналіз	Відсутність достовірних джерел інформації щодо обраного ринку, складнощі у проведенні власного аналізу	Недостатній досвід здійснення маркетингового аналізу у агросфері
	формування комерційної пропозиції	Неправильно виявлена потреба у споживачів	Недостатня комунікація між розробником процесу (біотехнологом) та маркетологом
	патентний пошук	Несвоєчасне оновлення баз даних, зміна законодавства щодо охорони об'єктів інтелектуальної власності	Обрання неефективної стратегії пошуку, недостатня кваліфікація
	розробка стартап проєкту	Різка зміна ситуації на ринку (поява нових більш сильних конкурентів)	Помилки у розрахунках, недостатній досвід у розробці стартапів
	пошук фінансування	Скорочення грантових програм, зміни в умовах кредитування для бізнесу	Відсутність досвіду у залученні великих обсягів коштів
Підготовка запуску виробництва	реєстрація підприємства	Зміна податкового законодавства, додаткові вимоги щодо отримання продуктів з ГМ-організмів	Неправильно обрана організаційно-правова форма, неправильно обрані КВЕДи
	пошук приміщення для оренди і заключення договору	Зміна орендодавця, умов оренди	Несвоєчасне виявлення технічних проблем з приміщенням
	облаштування виробничого приміщення	Зміни регуляторних вимог щодо облаштування виробничих та	Перевищення бюджету на облаштування, помилки у проєктуванні

Продовження таблиці 3.24

1	2	3	4
		лабораторних приміщень	
	закупівля обладнання, сировини та матеріалів	Зміна вартості матеріалів та обладнання через зміну валютного курсу, залежність від одного виробника	Невраховані характеристики обладнання у ТЗ, помилки у розрахунках щодо кількості матеріалів та обладнання
	відпрацювання технології	Недоступність обладнання	Неправильно налаштоване обладнання
	розробка та впровадження НТД	Зміни у нормативних вимог (ДСТУ, GMP)	Невідповідність НТД реальним технологічним процесам
	підбір та навчання персоналу	Дефіцит кваліфікованих кадрів	Слабка система мотивацій компанії
Етап впровадження (пілотне виробництво)	закупівля обладнання, сировини та матеріалів	Зміна вартості матеріалів та обладнання через зміну валютного курсу, залежність від одного виробника	Невраховані характеристики обладнання у ТЗ, помилки у розрахунках щодо кількості матеріалів та обладнання
	інтеграція технології у виробничий процес	Хвороби рослин, зміна регуляторних вимог щодо культивування ГМ-рослин, нерегулярне електропостачання	Недостатня автоматизація, проблеми з підбором оптимальних умов для культивування продуцента
	валідація технології	Нерегулярне електропостачання (вплив на фізіологію продуцента)	Недостатність досвіду персоналу для валідації технологічного процесу
	підготовка документів до реєстрації продукту	Зміни в законодавстві, що стосуються ГМ-організмів, реєстрації кормових добавок	Недостатність досвіду підготовки досє для реєстрації кормових добавок
	підготовка виробництва до перевірки відповідності вимогам GMP	Зміна законодавства щодо умов GMP	Недостатня підготовка персоналу перед аудитом
Масова реалізація	вихід на планові виробничі потужності	Нерегулярне електропостачання (вплив на фізіологію продуцента)	Неоднорідність виходу білка у різних серіях
	маркетингова кампанія	Недовіра до ГМО-продуктів	Помилки у позиціонуванні продукту
	налагодження логістики товару споживачам	Втрата запасів продукту внаслідок воєнних дій	Нестача складських площ

Кінець таблиці 3.24

1	2	3	4
	розширення клієнтської бази	Висока конкуренція з підкислювачами кормів	Відсутність скриптів продажів, висока вартість залучення клієнта

Аналіз ймовірності настання ризиків наведено у табл. 3.25:

Таблиця 3.25 – Ризики інноваційної розробки та ймовірність їх настання

Види ризиків	Назва ризику	Ймовірність настання (низька = 1, середня=2, висока=3)	Вплив на очікуваний результат (низький = 1, середній=2, високий=3)	Кінцева оцінка (добуток критеріїв)
1	2	3	4	5
Зовнішні ризики				
Ризик бізнес-подій	Відсутність достовірних джерел інформації щодо обраного ринку або складнощі у проведенні власного аналізу	1	2	2
	Неправильно виявлена потреба у споживачів	2	3	6
Науково-технічний	Несвоєчасне оновлення баз даних	1	2	2
Політико-законодавчий	зміна законодавства щодо охорони об'єктів інтелектуальної власності	1	1	1
Науково-технічний	Різка зміна ситуації на ринку (поява нових більш сильних конкурентів)	1	3	3
Інвестиційний	Скорочення грантових програм, зміни в умовах кредитування для бізнесу	2	3	6
Політично-законодавчий	Зміна податкового законодавства, додаткові вимоги щодо отримання продуктів з ГМ-організмів	1	3	3
Товарний	Зміна орендодавця, умов оренди	1	3	3
Політико-законодавчий	Зміни регуляторних вимог щодо облаштування виробничих та лабораторних приміщень	1	3	3
Валютний	Зміна вартості матеріалів та обладнання через зміну валютного курсу	2	2	4

Продовження таблиці 3.25

1	2	3	4	5
Товарний	залежність від одного виробника	2	2	4
	Недоступність обладнання	1	3	3
Політико-законодавчий	Зміни нормативних вимог (ДСТУ, GMP)	1	3	3
Культурно-соціальний, демографічний	Дефіцит кваліфікованих кадрів	3	3	9
Природно-екологічний	Хвороби рослин	2	3	6
Політико-законодавчий	зміна регуляторних вимог щодо культивування ГМ-рослин	2	3	6
Природно-екологічний	Нерегулярне електропостачання (вплив на фізіологію продуцента)	3	3	9
Культурно-соціальний	Недовіра до ГМО-продуктів	2	3	6
Системний	Втрата запасів продукту внаслідок влєнних дій	3	3	9
Ризик бізнес-подій	Висока конкуренція з підкислювачами кормів	2	3	6
Внутрішні ризики				
Ризик персоналу	Недостатній досвід здійснення маркетингового аналізу у агросфері	2	2	4
	Недостатня комунікація між розробником процесу (біотехнологом) та маркетологом	2	2	4
	Обрання неефективної стратегії пошуку, недостатня кваліфікація	2	2	4
	Помилки у розрахунках, недостатній досвід у розробці стартапів	2	3	6
Управлінський	Відсутність досвіду у залученні великих обсягів коштів	3	2	6
	Неправильно обрана організаційно-правова форма, неправильно обрані КВЕДи	1	2	2

1	2	3	4	5
Техніко-технологічний	Несвоєчасне виявлення технічних проблем з приміщенням	2	3	6
	помилки у проєктуванні	1	3	3
Фінансовий	Перевищення бюджету на облаштування	2	3	6
Техніко-технологічний	Невраховані характеристики обладнання у ТЗ, помилки у розрахунках щодо кількості матеріалів та обладнання	2	3	6
	Неправильно налаштоване обладнання	2	3	6
	Невідповідність НТД реальним технологічним процесам	2	3	6
Управлінський	Слабка система мотивацій компанії	1	2	2
Техніко-технологічний	Недостатня автоматизація, проблеми з підбором оптимальних умов для культивування продуцента	3	2	6
Ризик персоналу	Недостатність досвіду персоналу для валідації технологічного процесу	2	2	4
	Недостатність досвіду підготовки досьє для реєстрації кормових добавок	1	2	2
	Недостатня підготовка персоналу перед аудитом	2	3	6
Техніко-технологічний	Неоднорідність виходу білка у різних серіях	2	3	6
Інформаційний	Помилки у позиціонуванні продукту	1	3	3
Майновий	Нестача складських площ	1	2	2
Інформаційний	Відсутність скриптів продажів	1	2	2
Фінансовий	висока вартість залучення клієнта	2	2	2

Матриця оцінки ризиків наведена у табл. 3.26.

Таблиця 3.26 – 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	4	5
Високий рівень впливу	3	8	14	3
Середній рівень впливу	2	7	7	2
Низький рівень впливу	1	1	0	0

План заходів з управління ризиками наведено у табл. 3.27:

Таблиця 3.27 – План заходів з управління ризиками

Назва ризику	Назва методу управління ризиком	Відповідальні виконавці	Період виконання методу	Очікувані результати від впровадження методів управління
1	2	3	4	5
Відсутність достовірних джерел інформації щодо обраного ринку або складнощі у проведенні власного аналізу	Аутсорсинг ризику	Маркетолог	Розробка ідеї стартапу	Отримання достовірної інформації щодо ЦА та її потреб
Недостатній досвід здійснення маркетингового аналізу у агросфері				
Неправильно виявлена потреба у споживачів				
Недостатня комунікація між розробником процесу (біотехнологом) та маркетологом	Прийняття ризику	Маркетолог, біотехнолог		Налагодження комунікації
Несвоєчасне оновлення патентних баз даних	Здобуття додаткової інформації	Біотехнолог		Отримання вичерпної інформації щодо подібних розробок
Зміна законодавства щодо охорони об'єктів інтелектуальної власності	Моніторинг соціально-економічного та			Моніторинг законодавства

Продовження таблиці 3.27

1	2	3	4	5
Зміна законодавства щодо охорони об'єктів інтелектуальної власності	правового середовища;	Маркетолог, біотехнолог		
Обрання неефективної стратегії пошуку, недостатня кваліфікація	Аутсорсинг ризику			Отримання вичерпної інформації щодо подібних розробок
Різка зміна ситуації на ринку (поява нових більш сильних конкурентів)	Стратегічне планування діяльності			Моніторинг конкурентів для своєчасного коректування маркетингової стратегії
Помилки у розрахунках, недостатній досвід у розробці стартапів	Аутсорсинг ризику			Отримання правильно оформленого стартапу з коректними даними
Скорочення грантових програм, зміни в умовах кредитування для бізнесу	Прогнозування зовнішньої економічної ситуації			Наявні рішення щодо фінансування проєкту при різних сценаріях
Відсутність досвіду у залученні великих обсягів коштів	Відмова від ризику			Поступове залучення коштів
Зміна податкового законодавства	Моніторинг соціально-економічного та правового середовища;	Генеральний директор	Підготовка запуску виробництва	Моніторинг законодавства
Зміна орендодавця, умов оренди	Надання гарантій, поручительства	Біотехнолог, маркетолог, генеральний директор		Передбачення можливих змін орендодавця і умов оренди у договорі
Зміни регуляторних вимог щодо облаштування виробничих та	Моніторинг соціально-економічного та	Біотехнолог, слюсар, лаборант		Моніторинг законодавства

Продовження таблиці 3.27

1	2	3	4	5
лабораторних приміщень (GMP, GLP)	правового середовища;			
Зміна вартості матеріалів та обладнання через зміну валютного курсу	Запозичення (кредитування)	Біотехнолог, генеральний директор		Покриття можливих перевитрат
Залежність від одного виробника	Здобуття додаткової інформації			Створення баз альтернативних постачальників
Недоступність обладнання	Відмова від ризику	Біотехнолог, менеджер з систем якості, слюсар, лаборант		
Дефіцит кваліфікованих кадрів	Моніторинг соціально-економічного середовища	Біотехнолог, менеджер з систем якості, генеральний директор		Наявність на виробництві програм навчання для можливості рекрутингу кандидатів з малим досвідом або без нього
Неправильно обрана організаційно-правова форма, неправильно обрані КВЕДи	Відмова від ризику	Генеральний директор		Додавання необхідних КВЕДів
Несвоєчасне виявлення технічних проблем з приміщенням		Біотехнолог, маркетолог, генеральний директор		Розробка технічних рішень для даного приміщення
Перевищення бюджету на облаштування, помилки у проектуванні	Запозичення (кредитування)	Біотехнолог, слюсар, лаборант		Покриття можливих перевитрат
Невраховані характеристики обладнання у ТЗ, помилки у розрахунках щодо кількості матеріалів та обладнання	Відмова від ризику	Біотехнолог, генеральний директор		Корегування ТЗ та технологічної документації
Неправильно налаштоване обладнання		Біотехнолог, менеджер з		Проведення систематичних

Продовження таблиці 3.27

1	2	3	4	5
		систем якості, слюсар, лаборант		перевірок обладнання
Невідповідність НТД реальним технологічним процесам		Біотехнолог, менеджер з систем якості		Приведення технологічного процесу вимогам НТД
Слабка система мотивацій компанії		Біотехнолог, менеджер з систем якості, генеральний директор		Розроблена гнучка система мотивації персоналу
Хвороби рослин	Самострахув ання	Біотехнолог, хімік, менеджер з систем якості, слюсар, лаборант		Проведення регулярних профілактичних заходів
Зміна регуляторних вимог щодо культивування ГМ- рослин	Моніторинг соціально- економічного та правового середовища;			Моніторинг законодавства
Нерегулярне електропостачання (вплив на фізіологію продуцента)	Самострахув ання	Біотехнолог, хімік, менеджер з систем якості		Наявні резервні джерела живлення
Зміни в законодавстві, що реєстрації кормових добавок	Моніторинг соціально- економічного та правового середовища;			Моніторинг законодавства
Недостатня автоматизація, проблеми з підбором оптимальних умов для культивування продуцента	Відмова від ризиків	Біотехнолог, хімік, менеджер з систем якості, слюсар, лаборант		Моделювання різних режимів культивування у лабораторних умовах з подальшим масштабуванням
Недостатність досвіду персоналу для валідації технологічного процесу		Біотехнолог, хімік, менеджер з систем якості		Проведення навчання для співробітників
Недостатність досвіду підготовки досвідчених реєстрації кормових добавок				

Кінець таблиці 3.27

1	2	3	4	5
Недостатня підготовка персоналу перед аудитом	Відмова від ризику	Біотехнолог, хімік, менеджер з систем якості		Проведення навчання для співробітників
Недовіра до ГМО-продуктів	Активний цілеспрямований маркетинг	Менеджер з продажів, маркетолог, генеральний директор, заступник генерального директора	Масова реалізація	Підвищення обізнаності споживачів щодо безпечності продукту
Втрата запасів продукту внаслідок воєнних дій	Створення резервів	Генеральний директор, заступник генерального директора, комірник		Створення грошових фондів на компенсацію непередбачуваних витрат
Висока конкуренція з підкислювачами кормів	Активний цілеспрямований маркетинг	Менеджер з продажів, маркетолог, генеральний директор, заступник генерального директора		Акцентування на ефективності, а також на додаткових перевагах (додана харчова цінність)
Помилки у позиціонуванні продукту		Менеджер з продажів, маркетолог, генеральний директор, заступник генерального директора		
Нестача складських площ	Аутсорсинг ризику	Генеральний директор, заступник генерального директора, комірник		Оренда складських приміщень
Відсутність скриптів продажів, висока вартість залучення клієнта	Відмова від ризику	Менеджер з продажів, маркетолог, генеральний директор, заступник генерального директора		Впроваджені заходи, що сприяють формуванню клієнтської бази оптових покупців

Таким чином, у ході розробки стартап-проєкту з виробництва кормових добавок з антибактеріальною активністю та високим вмістом біоактивних речовин та білка було проаналізовано зовнішнє та внутрішнє середовище майбутнього підприємства. Було визначено ключові фактори успіху проєкту, що полягають у позитивному впливі на харчову цінність корму та простоті застосування. Крім цього, у ході дослідження ринку були виявлені потенційні споживачі, а саме фермерські господарства та дистриб'ютори ветеринарних препаратів.

Техніко-економічні розрахунки дозволили визначити конкурентну ціну розробленого продукту, що складає 850 грн/кг. З плановим виробництвом у 26 000 кг продукту на рік період капіталовкладень у проєкт становить 0,99 роки, а його рентабельність – 114,19 % на рік. Для досягнення точки беззбитковості необхідно реалізувати 3500 кг продукції.

Визначена бізнес-модель стартапу, а також основні ризики, що можуть виникнути на кожному етапі розвитку стартап-проєкту. Завдяки розробленому ефективному управлінню настання ризику або його вплив буде мінімізовано.

За результатами розробленого стартап-проєкту технологія отримання кормових добавок з антибактеріальною активністю та високим вмістом біоактивних речовин та білка з трансгенних рослин *B. oleraceae* var. *acephala* має потенціал комерційного впровадження.

ВИСНОВКИ

- Експресія рекомбінантних терапевтичних білків у рослинах, зокрема у капусті є перспективною, що було продемонстровано на прикладі ефективної експресії та стабільного успадкування гена *ста*, високої антимікробної активності цільового продукту (біомаси з коліцином М), придатної для використання у якості антибактеріального засобу для обробки сировини для кормів з метою профілактики ешерихіозів.
- Проведені дослідження показали антимікробну активність екстрактів з трансгенної капусти кале, яка продукує коліцин М, як з рослин T_0 , так і T_1 та T_2 поколінь. Було підтверджено, що ген коліцину М спадкується та експресується у T_1 та T_2 поколіннях.
- Антибактеріальна активність екстрактів з коліцином М залежить від умов культивування рослин: активність екстрактів вища щонайменше у 8-32 рази при виділенні з трансгенних рослин, які культивували в тепличних умовах, порівняно з вирощеними в умовах *in vitro*.
- Визначено, що при зберіганні водних екстрактів з коліцином М за температури 2-8 °С антимікробна активність поступово зменшується (на 1-2 порядки в день), але не зникає протягом щонайменше 5 днів, що показує відносну стійкість коліцину у водних розчинах.
- Виявлено, що умови висушування біомаси впливають на антибактеріальну активність екстрактів з коліцином при тривалому зберіганні. Висушування при кімнатній температурі або протягом мінімального часу при 40 °С дозволяє зберегти вищу антимікробну активність.
- Показано захисний антимікробний ефект при обробці зерна порошком біомаси з трансгенної капусти при використанні 1 – 10 % сушеного порошка.

- За результатами розробленого стартап-проєкту технологія отримання кормових добавок з антибактеріальною активністю та високим вмістом біоактивних речовин та білка з трансгенних рослин *B. oleraceae* var. *acephala* має потенціал комерційного впровадження. Проведені розрахунки дозволили визначити конкурентну ціну розробленого продукту, що складає 850 грн/кг. З плановим виробництвом у 26 000 кг продукту на рік період капіталовкладень у проєкт становить 0,99 роки, а його рентабельність – 114,19 % на рік. Отримані результати підтверджують, що виробництво коліцину М у формі висушеної біомаси трансгенної капусти є перспективною розробкою, яка, згідно з проведеними розрахунками, має потенціал комерційної реалізації.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Accumulation of colicin M protein and its biological activity in transgenic lettuce and mizuna plants / N. Shcherbak et al. *Frontiers in Plant Science*. 2023. Vol. 14. C. 1–13. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1271757>
2. Colicins and Microcins Produced by Enterobacteriaceae: Characterization, Mode of Action, and Putative Applications / K. G. Marković et al. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2022. Vol. 19, no. 18. C. 11825. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph191811825>
3. Production of recombinant colicin M in *Nicotiana tabacum* plants and its antimicrobial activity / E. Łojewska et al. *Plant Biotechnology Reports*. 2019. Vol. 14, no. 1. C. 33–43. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11816-019-00571-y>
4. Broad and efficient control of major foodborne pathogenic strains of *Escherichia coli* by mixtures of plant-produced colicins / S. Schulz et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015. Vol. 112, no. 40. C. E5454–E5460. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1513311112>
5. Gleba Y. Y., Tusé D., Giritch A. Plant Viral Vectors for Delivery by *Agrobacterium*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Berlin, Heidelberg, 2013. C. 155–192. DOI: https://doi.org/10.1007/82_2013_352
6. Satheesh N., Workneh Fanta S. Kale: Review on nutritional composition, bio-active compounds, anti-nutritional factors, health beneficial properties and value-added products. *Cogent Food & Agriculture*. 2020. Vol. 6, no. 1. C. 1–31. DOI: <https://doi.org/10.1080/23311932.2020.1811048>
7. Highly Variable Aggregation and Glycosylation Profiles and Their Roles in Immunogenicity to Protein-Based Therapeutics / S. Sarsarshahi et al. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2025. C. 1–19. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2025.103771>

8. Recent Progress on Vaccines Produced in Transgenic Plants / G. Gaobotse et al. *Vaccines*. 2022. Vol. 10, no. 11. C. 1861. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines10111861>
9. Critical Analysis of the Commercial Potential of Plants for the Production of Recombinant Proteins / S. Schillberg et al. *Frontiers in Plant Science*. 2019. Vol. 10. C. 1–10. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00720>
10. Parvathy S. T. Engineering Plants as Platforms for Production of Vaccines. *American Journal of Plant Sciences*. 2020. Vol. 11, no. 05. C. 707–735. DOI: <https://doi.org/10.4236/ajps.2020.115052>
11. Transient recombinant expression of highly immunogenic CagA, VacA and NapA in *Nicotiana benthamiana* / R. Barzigar et al. *Biotechnology Reports*. 2022. Vol. 33. C. e00699. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00699>
12. Drapal M., Enfissi E. M. A., Fraser P. D. Metabolic changes in leaves of *N. tabacum* and *N. benthamiana* during plant development. *Journal of Plant Physiology*. 2021. Vol. 265. C. 153486. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153486>
13. Expression of antibodies and Fab fragments in transgenic potato plants: a case study for bulk production in crop plants / C. De Wilde et al. *Molecular Breeding*. 2002. Vol. 9, no. 4. C. 271–282. DOI: <https://doi.org/10.1023/a:1020306917914>
14. Expression of human coagulation Factor IX in transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum*) / L. Zhao et al. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2007. Vol. 48, no. 2. C. 101. DOI: <https://doi.org/10.1042/ba20060224>
15. Pérez-Mesa P. A., Roda F. Alkaloid evolution in the Solanaceae. *Current Opinion in Plant Biology*. 2025. Vol. 85. C. 102727. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2025.102727>
16. Long-Lasting Stable Expression of Human LL-37 Antimicrobial Peptide in Transgenic Barley Plants / M. Mirzaee et al. *Antibiotics*. 2021. Vol. 10, no. 8. C. 898. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080898>
17. Protein content determination in *Brassica oleracea* species using FT-NIR technique and PLS regression / T. Szigedi et al. *International Journal of Food*

- Science & Technology*. 2011. Vol. 47, no. 2. C. 436–440.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02848.x>
18. The Role of Glucosinolates from Cruciferous Vegetables (Brassicaceae) in Gastrointestinal Cancers: From Prevention to Therapeutics / C. Melim et al. *Pharmaceutics*. 2022. Vol. 14, no. 1. C. 190.
DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010190>
19. Collard and cauliflower as a base for production of recombinant antigens / N. Pogrebnyak et al. *Plant Science*. 2006. Vol. 171, no. 6. C. 677–685.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.06.017>
20. Protein, amino acid, ash and mineral contents in Brassica spp. grown in Northwest Spain / S. Martínez et al. *International Journal of Food Science & Technology*. 2010. Vol. 46, no. 1. C. 146–153. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02463.x>
21. Kale / J. A. Pellicer et al. *Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables*. 2020. C. 159–179. DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812780-3.00010-6>
22. Gerszberg A. Tissue culture and genetic transformation of cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*): an overview. *Planta*. 2018. Vol. 248, no. 5. C. 1037–1048.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2961-3>
23. Gene duplication and stress genomics in Brassicas: Current understanding and future prospects / S. Das Laha et al. *Journal of Plant Physiology*. 2020. Vol. 255. C. 153293. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153293>
24. Genetic, Bio-Agronomic, and Nutritional Characterization of Kale (*Brassica Oleracea* L. var. *Acephala*) Diversity in Apulia, Southern Italy / C. Lotti et al. *Diversity*. 2018. Vol. 10, no. 2. C. 25.
DOI: <https://doi.org/10.3390/d10020025>
25. Transcriptome analysis and metabolic profiling of green and red kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) seedlings / J. Jeon et al. *Food Chemistry*. 2018. Vol. 241. C. 7–13. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.067>

26. Biotechnological interventions of improvement in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) / A. Jabeen et al. *Scientia Horticulturae*. 2024. Vol. 329. C. 112966. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2024.112966>
27. Gambhir G., Kumar P., Srivastava D. K. High frequency regeneration of plants from cotyledon and hypocotyl cultures in *Brassica oleracea* cv. Pride of India. *Biotechnology Reports*. 2017. Vol. 15. C. 107–113. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.02.005>
28. Establishment of a stable, effective and universal genetic transformation technique in the diverse species of *Brassica oleracea* / X. Sheng et al. *Frontiers in Plant Science*. 2022. Vol. 13. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1021669>
29. Technological Development and Application of Plant Genetic Transformation / W. Su et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24, no. 13. C. 10646. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms241310646>
30. An efficient improved CRISPR mediated gene function analysis system established in *Lycium ruthenicum* Murr. / P. Ai et al. *Industrial Crops and Products*. 2023. Vol. 192. C. 116142. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.116142>
31. Plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of the miracle tree *Neolamarckia cadamba* / J. Li et al. *Industrial Crops and Products*. 2019. Vol. 130. C. 443–449. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.009>
32. Ahmad N., Nielsen B. L., Mansoor S. Editing the plastid genome of recalcitrant plant species. *Trends in Genetics*. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.08.001>
33. Plastid Transformation in Cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) by the Biolistic Process / M.-J. Tseng et al. *Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ, 2014. C. 355–366. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-995-6_23
34. Nuclear and plastid transformation of *Brassica oleracea* var. *botrytis* (cauliflower) using PEG-mediated uptake of DNA into protoplasts / G. D. Nugent et al. *Plant Science*. 2006. Vol. 170, no. 1. C. 135–142. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.08.020>

- 35.Christey M. C., Sinclair B. K. Regeneration of transgenic kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*), rape (*B. napus*) and turnip (*B. campestris* var. *rapifera*) plants via *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation. *Plant Science*. 1992. Vol. 87, no. 2. C. 161–169. DOI: [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(92\)90147-e](https://doi.org/10.1016/0168-9452(92)90147-e)
- 36.High efficiency transformation of *Brassica oleracea* var. *botrytis* plants by *Rhizobium rhizogenes* / T. Kowalczyk et al. *AMB Express*. 2018. Vol. 8, no. 1. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0656-6>
- 37.Glucosinolate Biosynthesis in Hairy Root Cultures of Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) / S.-J. Kim et al. *Natural Product Communications*. 2013. Vol. 8, no. 2. C. 217–220. DOI: <https://doi.org/10.1177/1934578X13008002>
- 38.Beyeler M., Albach D. C. *In vitro* Micropropagation of Kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica* L.). *Horticulturae*. 2025. Vol. 11, no. 7. C. 767. DOI: <https://doi.org/10.3390/horticulturae11070767>
- 39.Stable chloroplast transformation in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) by particle bombardment / C.-W. Liu et al. *Plant Cell Reports*. 2007. Vol. 26, no. 10. C. 1733–1744. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0374-z>
- 40.Optimization of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and shoot regeneration after co-cultivation of cabbage (*Brassica oleracea* subsp. *capitata*) cv. KY Cross with *AtHSP101* gene / A. Rafat et al. *Scientia Horticulturae*. 2010. Vol. 124, no. 1. C. 1–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.11.015>
- 41.Länneppää M. Heterologous expression of *AtMYB12* in kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) leads to high flavonol accumulation. *Plant Cell Reports*. 2014. Vol. 33, no. 8. C. 1377–1388. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-014-1623-6>
- 42.An efficient and universal protoplast-based transient gene expression system for genome editing in *Brassica* crops / X. Yu et al. *Horticultural Plant Journal*. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2024.06.001>
- 43.Structural and functional insights into colicin: a new paradigm in drug discovery / F. Calcuttawala et al. *Archives of Microbiology*. 2021. Vol. 204, no. 1. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02689-6>

44. Colicins and Salmocins – New Classes of Plant-Made Non-antibiotic Food Antibacterials / S. Hahn-Löbmann et al. *Frontiers in Plant Science*. 2019. Vol. 10. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00437>
45. The Biology of Colicin M and Its Orthologs / D. Ch  rier et al. *Antibiotics*. 2021. Vol. 10, no. 9. C. 1109. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091109>
46. Gordon D. M., O'Brien C. L. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*. *Microbiology*. 2006. Vol. 152, no. 11. C. 3239–3244. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.28690-0>
47. A new biofilm-associated colicin with increased efficiency against biofilm bacteria / O. Rendueles et al. *The ISME Journal*. 2014. Vol. 8, no. 6. C. 1275–1288. DOI: <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.238>
48. Colicin Z, a structurally and functionally novel colicin type that selectively kills enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains / L. Micenkov   et al. *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9, no. 1. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47488-8>
49. Cryo-EM structures of the *E. coli* Ton and Tol motor complexes / H. Celia et al. *Nature Communications*. 2025. Vol. 16, no. 1. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-025-61286-z>
50. Kim Y. C., Tarr A. W., Penfold C. N. Colicin import into *E. coli* cells: A model system for insights into the import mechanisms of bacteriocins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*. 2014. Vol. 1843, no. 8. C. 1717–1731. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.04.010>
51. Garde S., Chodisetti P. K., Reddy M. Peptidoglycan: Structure, Synthesis, and Regulation. *EcoSal Plus*. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0010-2020>
52. Lox-dependent gene expression in transgenic plants obtained via *Agrobacterium*-mediated transformation / N. Shcherbak et al. *Cytology and Genetics*. 2013. Vol. 47, no. 3. C. 145–155. DOI: <https://doi.org/10.3103/s0095452713030079>
53. Genetic transformation of kale (*Brassica oleracea* L, spp. *acephala* DC, var *sabellica* L.) with colicin and bar genes / O. Ovcharenko et al. *10th biennial*

- PSEPB Conference “Experimental plant biology at various scales: from molecules to environment”*, Katowice, 20–23 September 2021. С. 167.
- 54.ОТРИМАННЯ І ДОСЛІДЖЕННЯ Т2 ПОКОЛІННЯ КАПУСТИ КАЛЕ З ГЕНОМ ColM / О. Овчаренко та ін. *Біологія рослин та біотехнології: збірка тез V конференції молодих учених*, м. Київ, 15–16 трав. 2025 р. С. 39.
 - 55.Standardized Method for High-throughput Sterilization of Arabidopsis Seeds / B. E. Lindsey et al. *Journal of Visualized Experiments*. 2017. No.128. DOI: <https://doi.org/10.3791/56587>
 - 56.Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962. Vol. 15, no. 3. С. 473–497. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
 - 57.SOLUTION- 02 - Phosphate Buffered Saline (PBS) V.2 / M. Cosentino та ін. *Protocols.io*. 2020. URL: <https://doi.org/10.17504/protocols.io.biahkab6>
 - 58.Dusseldorf I. Bradford protein assay in 96-Well plate. *Protocols.io*. 2019. URL: <https://doi.org/10.17504/protocols.io.76xhrfn>
 - 59.Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976. Vol. 72, no. 1-2. P. 248–254. URL: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
 - 60.Monteith K. M. LB (Luria-Bertani) agar. *Protocols.io*. 2018. URL: <https://doi.org/10.17504/protocols.io.p43dqyn>.
 - 61.Balouiri M., Sadiki M., Ibensouda S. K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2016. Vol. 6, no. 2. С. 71–79. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
 - 62.Gaseous exchange-dependent in vitro culture extensively alters plant growth and metabolic landscape revealed by comprehensive metabolomics-based approach / A. K. Verma et al. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2025. P. 109765. URL: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2025.109765>
 - 63.Elucidating the impact of in vitro cultivation on *Nicotiana tabacum* metabolism through combined in silico modeling and multiomics analysis / J. Yu et

al. *Frontiers in Plant Science*. 2023. Vol. 14.

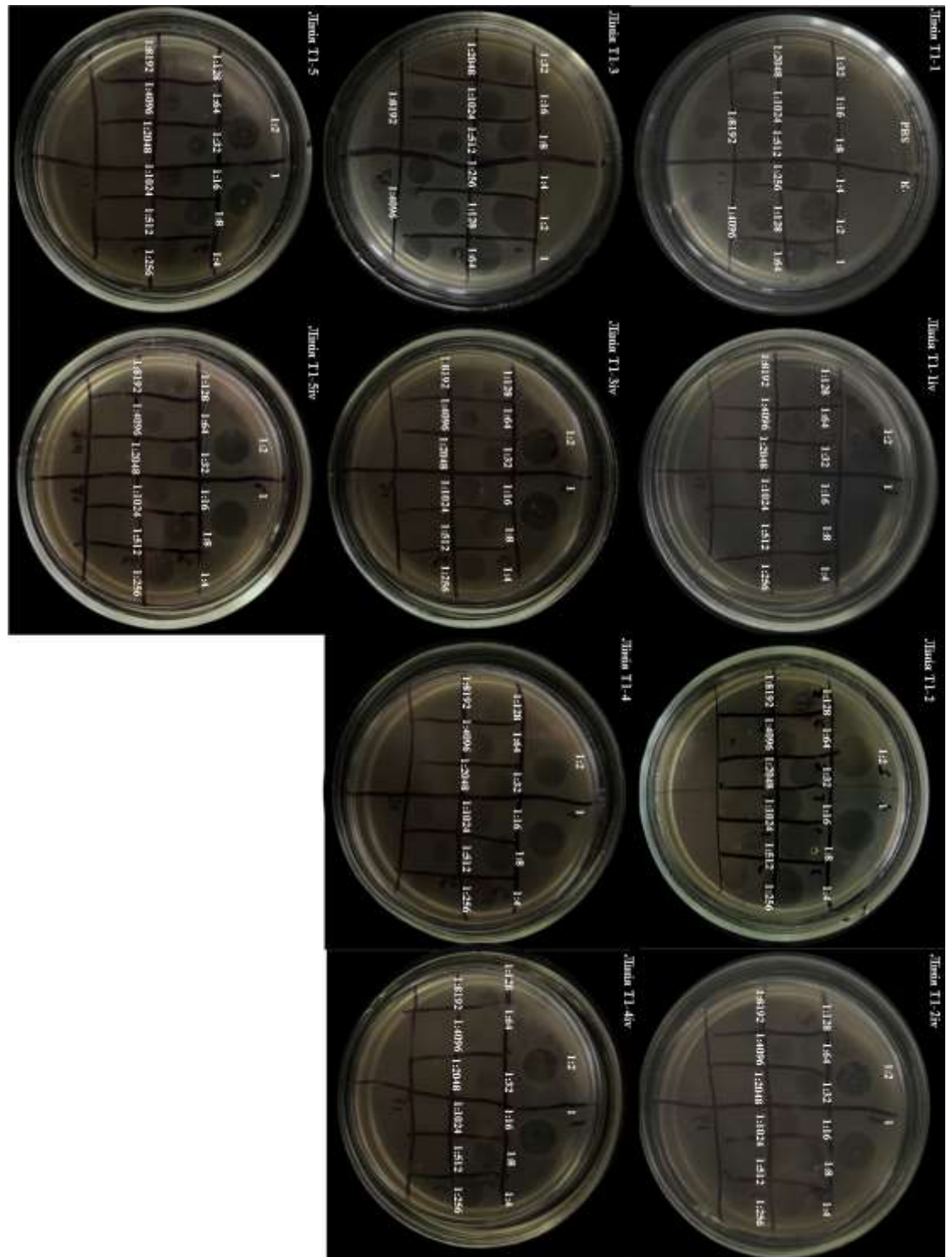
URL: <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1281348>

64. Heyduck R. F., VanLeeuwen D., Guldan S. J. Effect of Harvest Schedule on Organic Kale Grown during the Winter in High Tunnels. *HortTechnology*. 2020. Vol. 30, no. 5. P. 570–575. URL: <https://doi.org/10.21273/horttech04584-20>

ДОДАТКИ

Додаток А

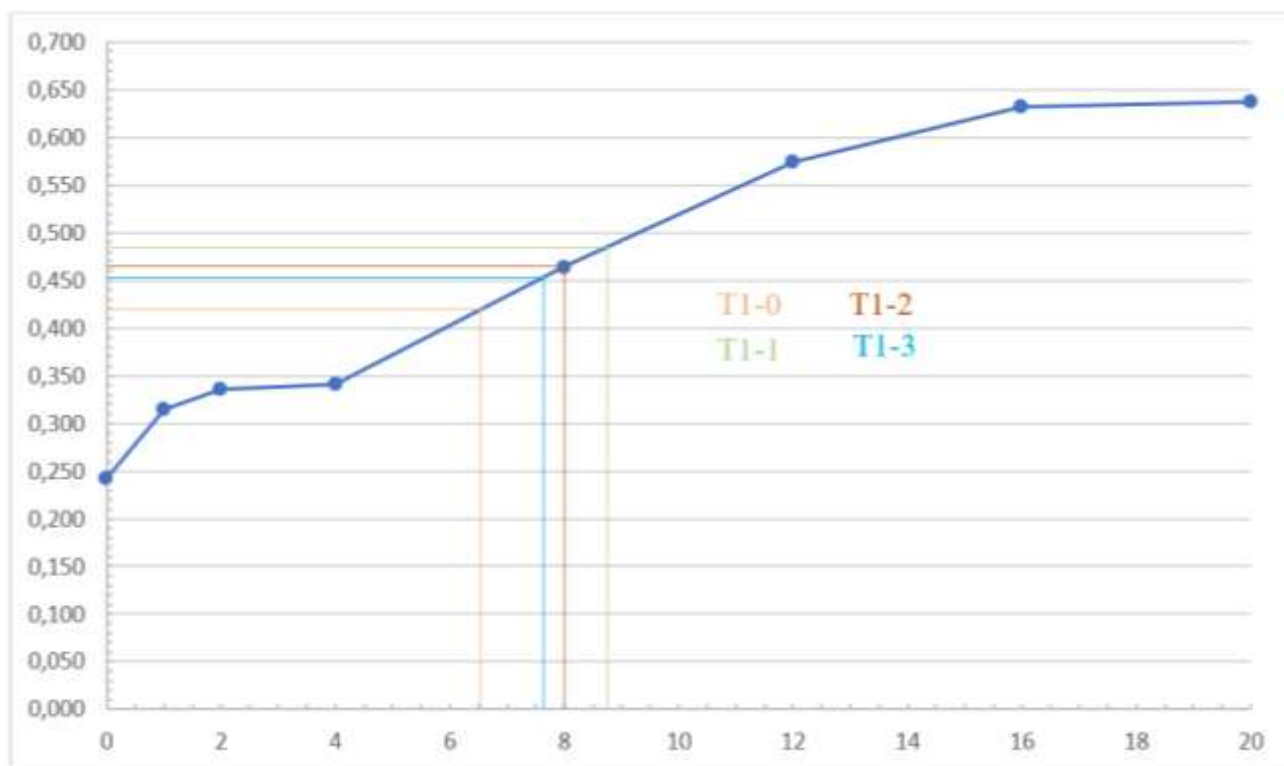
Результат визначення антибактеріальної активності коліцину М в екстрактах,
отриманих з рослин Т₁ покоління



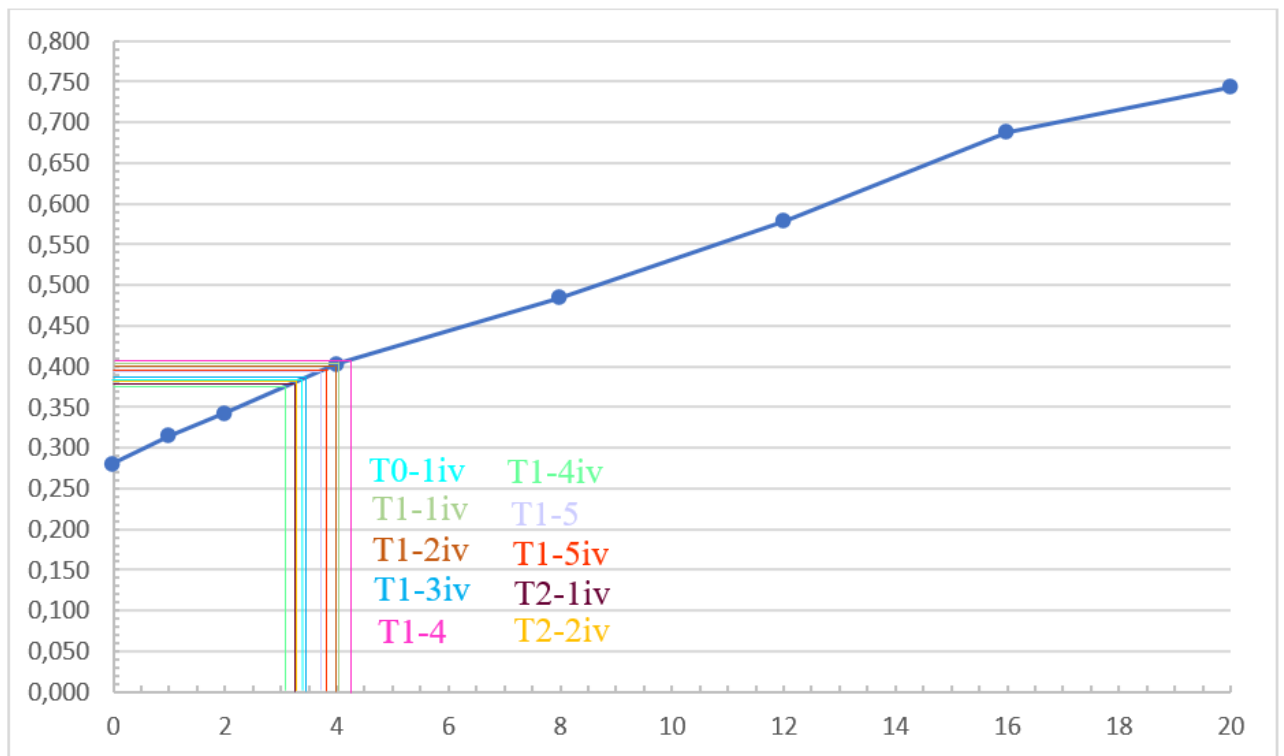
Додаток Б

Визначення вмісту загального розчинного білка (ЗРБ) у екстрактах, отриманих з рослин, що культивуються в тепличних умовах та в культурі *in vitro*

Лінія	Середнє значення OG_{595}
1	2
T0-1	0,421
T0-1iv	0,385
T1-1	0,485
T1-1iv	0,404
T1-2	0,463
T1-2iv	0,403
T1-3	0,433
T1-3iv	0,391
T1-4	0,406
T1-4iv	0,372
T1-5	0,389
T1-5iv	0,392
T2-1iv	0,379
T2-2iv	0,382



Градувальний графік для проб T0-1, T1-1, T1-2, T1-3

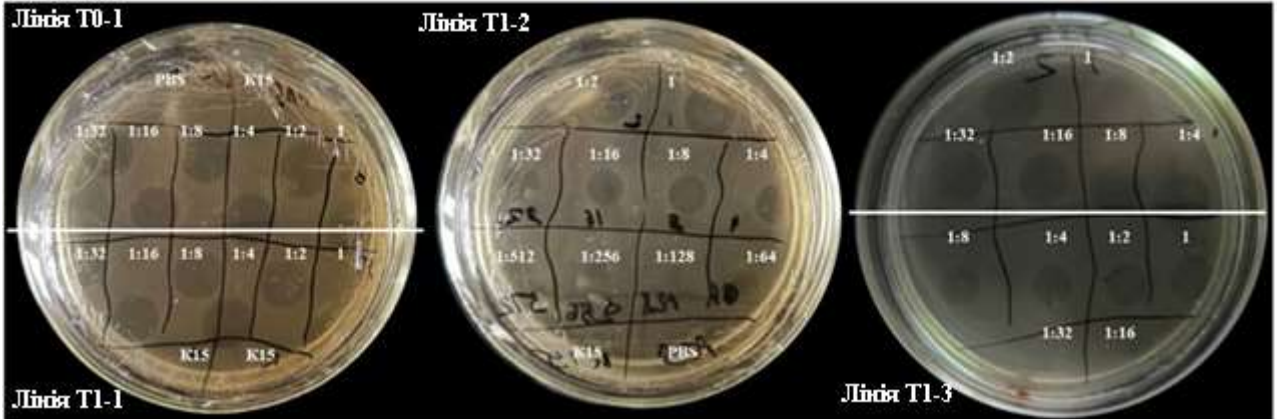


Градувальний графік для проб ліній, що культивувались в умовах *in vitro*

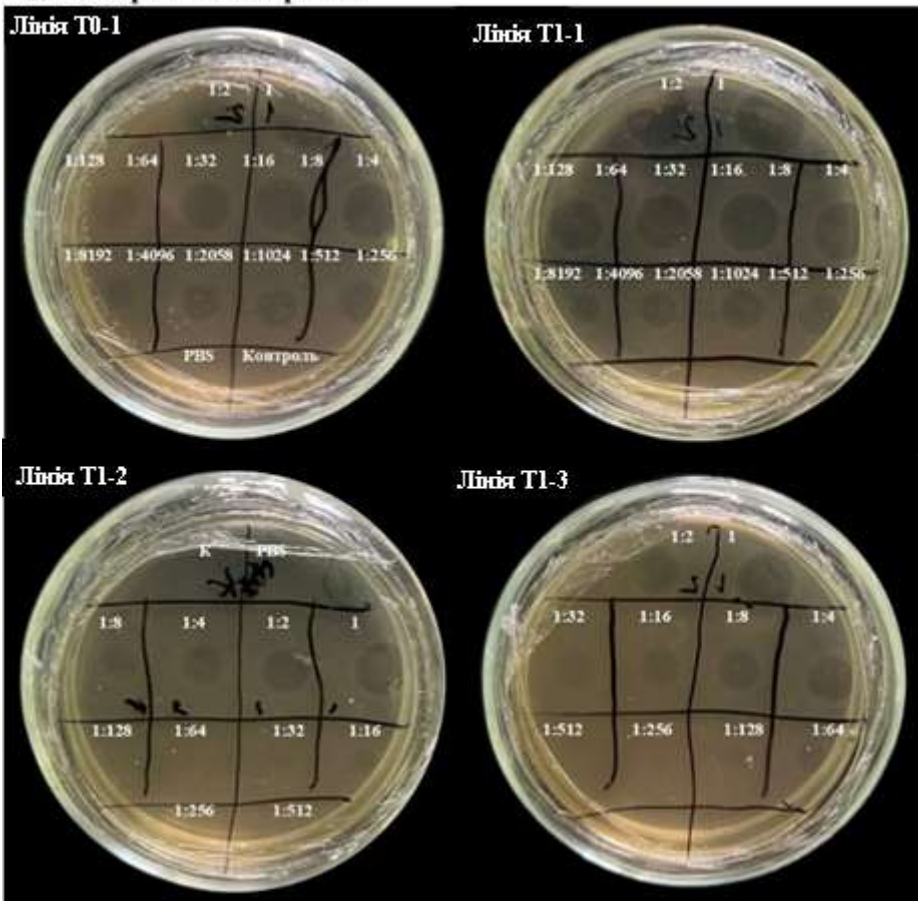
Додаток В

Дослідження стабільності коліцину М при зберіганні водних екстрактів
трансгенної капусти протягом 5 днів

1 день зберігання екстрактів



2 день зберігання екстрактів



4 день зберігання екстрактів

Ліній Т0-1



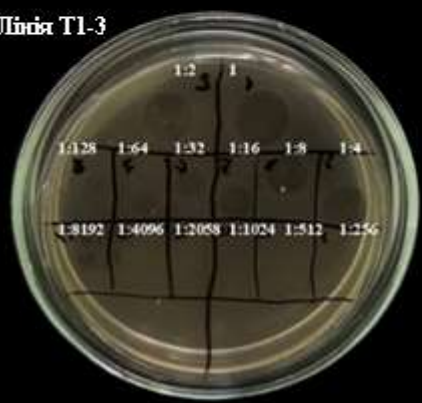
Ліній Т1-1



Ліній Т1-2



Ліній Т1-3



5 день зберігання екстрактів

Ліній Т0-1



Ліній Т1-1



Ліній Т1-2

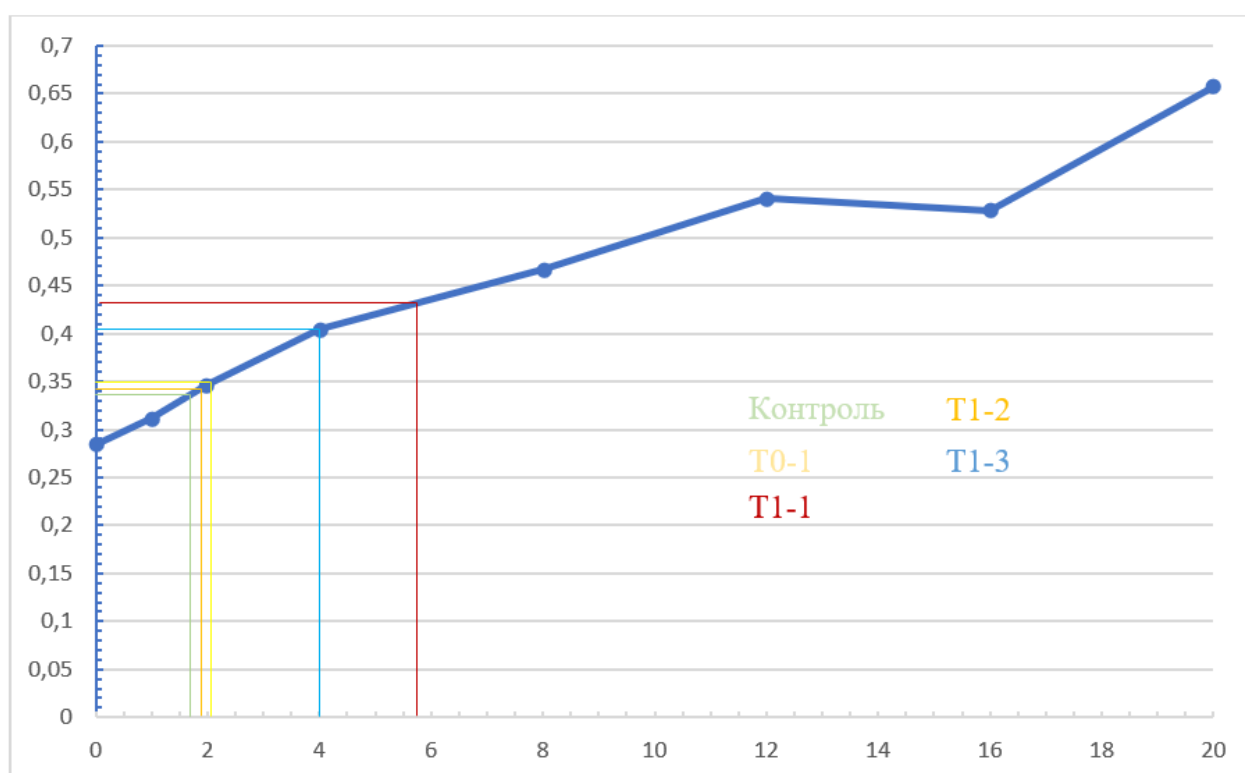


Ліній Т1-3



Визначення вмісту білка у досліджуваних пробах біомаси капусти, які зберігалися протягом 1 року

Лінія	Середнє значення OG_{595}
1	2
Контроль	0,336
T0-1	0,345
T1-1	0,432
T1-2	0,342
T1-3	0,406



Визначення вмісту білка у досліджуваних пробах за короткочасного висушування рослинного матеріалу капусти з коліцином М при зберіганні протягом 1 місяця

Лінія	Середнє значення OG_{595}
1	2
T0-1	0,368
T1-1	0,381
T1-2	0,417
T1-3	0,412

