

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ імені ІГОРЯ
СІКОРСЬКОГО»**

**Хіміко-технологічний факультет
Кафедра фізичної хімії**

«На правах рукопису»
УДК _____

ДО ЗАХИСТУ ДОПУЩЕНО
Завідувач кафедри
_____ Вікторія ВОРОБІЙОВА
«__» _____ 2024р.

**Магістерська дисертація
на здобуття ступеня магістра
на освітньо-професійною програмою
«Хімічні технології синтезу та фізико-хімічні властивості органічних
матеріалів»
зі спеціальності 161 «Хімічні технології та інженерія»
на тему: «Біокаталітичний синтез 12-оксофїтодієнної кислоти та її
біологічні властивості»**

Виконала: студентка 2 курсу, групи ХД-31 мп
Дарменко Марія Володимирівна _____

Науковий керівник:
к.б.н., доц. Хрокало Людмила Анатоліївна _____

Консультант: «Розроблення стартап-проекту»
Доц. Дергалюк Марта Олексіївна _____

Рецензент

Посада, науковий ступінь, вчене звання,

Прізвище, ім'я, по батькові _____

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

Київ-2024 року

ЗАВДАННЯ НА МАГІСТЕРСЬКУ ДИСЕРТАЦІЮ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»

Факультет	<u>Хіміко-технологічний</u>
Кафедра	фізичної хімії
Рівень вищої освіти –	другий (магістерський)
Спеціальність	161 «Хімічні технології та інженерія»
Освітньо-професійна програма	Хімічні технології синтезу та фізико-хімічні властивості органічних матеріалів

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ Вікторія ВОРОБІЙОВА

«__» _____ 2024р.

ЗАВДАННЯ

на магістерську дисертацію студенту

Дарменко Марія Володимирівна

1. Тема дисертації «Біокаталітичний синтез 12-оксофітодієнної кислоти та її біологічні властивості»
2. Науковий керівник дисертації к.б.н., доц. Хрокало Людмила Анатоліївна, професор, затверджені наказом по університету від «__» _____ 202_ р. № ____
3. Строк подання студентом дисертації 12 грудня 2024
4. Об'єкт дослідження: 12-оксофітодієнної кислота (12-ОФДК)
5. Предмет дослідження: біокаталітичний синтез 12-ОФДК, біологічні (антимікробні, регенеруючі, цитотоксичні) властивості одержаної сполуки
6. Перелік завдань, які потрібно розробити:

1) Виконати літературний огляд біосинтетичного шляху утворення 12-ОФДК та інших жасмонатів в хлоропластах рослин та підходів до лабораторного синтезу цільової сполуки

2) Опанувати протокол біокаталітичного синтезу 12-ОФДК, що складається з трьох послідовних реакцій в одній колбі за використання генетично модифікованого цілюноклітинного каталізатора

3) Провести дослідження на антимікробні властивості 12-ОФДК на тест культурах грампозитивної, грамнегативної бактерій та умовно-патогенних дріжджів.

4) Провести цитотоксичне і гентоксичне дослідження за методом *Alium sera* по відновленню клітин корінців цибулі у умовах кадмієвого стресу за обробки розчином 12-ОФДК.

5) Зробити економічні розрахунки по стартап-проекті біокаталітичного синтезу 12- ОФДК

7. Перелік графічного (ілюстративного) матеріалу – рисунки та таблиці розрахунків, що необхідні для ілюстрування матеріалів дослідження.

8. Орієнтовний перелік публікацій – публікація тез доповідей за темою магістерської дисертації.

9. Консультанти розділів дисертації

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		Завдання видав	Завдання прийняв
Розділи 1, 2, 3	к.б.н., доц. Хрокало Людмила Анатоліївна		
Стартап-проект	Дергалюк М. О., доцент кафедри економіки і підприємництва		

10. Дата видачі завдання 02.09.24.

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання магістерської дисертації	Термін виконання етапів	Примітка
1.	Літературний огляд	до 05.2024	
2.	Опанувати протокол біокаталітичного синтезу 12-ОФДК	до 06.2024	

3.	Провести дослідження на антимікробні властивості 12-ОФДК	до 07.2024	
4.	Провести цитотоксичне дослідження за методом <i>Alium sera</i>	до 08.2024	
5.	Провести гентоксичне дослідження за методом <i>Alium sera</i>	до 10.2024	
6.	Зробити економічні розрахунки по стартап-проєкту	до 10. 2024	
7.	Оформлення магістерської дисертації	до 11.2019	

Студент _____ Марія ДАРМЕНКО

Науковий керівник дисертації _____ Людмила ХРОКАЛО

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

12-ОФДК – 12-оксофїтодієнова кислота

13ЛОГ – 13-ліпооксигеназа

AtАОС – алленоксидсинтаза

AtАОЦ – алленоксидциклаза

13-ГПОТ – 13-гїдроперокси-9,11,15-октадекатрієнова кислота

CSC- – цистеїн

РЕФЕРАТ

Текст дисертації: 68 сторінки, 25 рисунків, 13 таблиці, 26 літературні посилань

У магістерській дисертації виконано огляд інноваційного методу біокаталітичного тристадійного синтезу 12-оксофітодієнової кислоти в одному реакторі за використання цілюноклітинного генетично модифікованого каталізатору. Проведенно дослідження на антимікробні властивості 12-ОФДК, виявлено бактерицидну дію відносно грампозитивної бактерії *B. subtilis*, фунгіцидну відносно дріжджоподібного грибка *C. albicans* та толерантність у грамнегативної *E. coli*. Проведенно цитотоксичне і генотоксичне дослідження за методом *Alium sera* по відновленню клітин корінців цибулі у умовах кадмієвого стресу за обробки розчином 12-ОФДК. Дослідження показало, що вплив Cd у концентрації 10 мкМ призводить до значного цитотоксичного та генотоксичного стресу, що супроводжується зниженням МІ на 20% порівняно з контролем та помітним пошкодженням клітин. Регенерація меристематичної тканини коренів за дії 12-ОФДК залежала від дози та часу, причому більш сприятливі показники відновлення спостерігалися через 12 днів порівняно з 4 днями. Найбільш значне посилення росту коренів та поділу клітин було зафіксовано за концентрації 12-ОФДК 10 мкМ. І навпаки, вплив 100 мкМ 12-ОФДК протягом 4 днів призводив до осмотичного шоку та посилення аберацій мітотичної фази.

Ключові слова:, 12-ОФДК, БІОКАТАЛІЗ ЦИТОТОКСИЧНІСТЬ, КАДМІЄВИЙ СТРЕС, ФІТОГОРМОН.

ABSTRACT

Text of the dissertation: 68 pages, 25 figures, 13 tables, 26 references

The master's thesis reviews an innovative method for the biocatalytic three-step synthesis of 12-oxophytodienoic acid in a single reactor using a whole-cell genetically modified catalyst. The antimicrobial properties of 12-OPDA were studied, and the bactericidal effect was found against the gram-positive bacterium *B. subtilis*, fungicidal

action against the yeast-like fungus *C. albicans* and tolerance in the gram-negative *E. coli* were found. The cytotoxic and genotoxic study was carried out using the *Alium cepa* method to restore onion root cells under cadmium stress after treatment with 12-OPDA solution. The study showed that exposure to Cd at a concentration of 10 μM leads to significant cytotoxic and genotoxic stress, accompanied by a 20% decrease in the MI compared to the control and noticeable cell damage. The regeneration of root meristematic tissue under the influence of 12-OPDA was dose- and time-dependent, with more favourable recovery rates observed after 12 days compared to 4 days. The most significant enhancement of root growth and cell division was recorded at a concentration of 10 μM 12-OPDA. Conversely, exposure to 100 μM 12-OPDA for 4 days led to osmotic shock and increased mitotic phase aberrations.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	5
РЕФЕРАТ.....	6
ЗМІСТ	8
ВСТУП.....	9
ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	11
1.1 12-оксофїтодієнова кислота.....	11
1.2 Мета дослідження біокаталітичного синтезу 12- ОФДК.....	18
1.3 Опис синтезу та його оптимізація.....	20
1.4 Синтез 12-ОФДК	22
1.5 Перспективи біокаталітичного отримання 12-ОФДК.....	31
МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ.....	34
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	39
СТРАТЕГІЯ МАРКЕТИНГУ ДЛЯ ВИВЕДЕННЯ НА РИНОК	50
4.1. Загальна характеристика розробки	51
4.2. Аналіз прогнозних ринкових позицій розробки.....	52
4.3. Фінансові складові розробки	58
4.4. Дослідження ринку	62
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	68

ВСТУП

12-ОФДК (12-оксофітодієнова кислота) — це органічна сполука, яка є одним із ключових компонентів у метаболічному шляху синтезу жасмонової кислоти. Жасмонова кислота та її похідні (жасмонати) є важливими фітогормонами, які регулюють широкий спектр фізіологічних процесів у рослинах, включаючи ріст, розвиток, відповідь на стреси та захист від патогенів і травоядних.

Для чого використовується 12-ОФДК:

1. Сигнальний молекула: 12-ОФДК служить проміжним продуктом у біосинтезі жасмонової кислоти. Це важливо для активації захисних механізмів рослин у відповідь на стреси, такі як механічне ушкодження або атака патогенів.
2. Ріст і розвиток рослин: Вплив на процеси росту, зокрема на формування квітів, плодів та регуляцію ряду генів, що залучені у ці процеси.
3. Стресові відповіді: Участь у регуляції генів, пов'язаних з відповіддю на абіотичні стреси (наприклад, посуха, холод) і біотичні стреси (наприклад, інфекції патогенів).
4. Сигналізація в міжклітинній взаємодії: Може впливати на міжклітинну сигналізацію, забезпечуючи координацію реакцій на стресові фактори між різними частинами рослини.

Таким чином, 12-ОФДК відіграє важливу роль у регуляції захисних реакцій рослин та забезпечує адаптивну відповідь на різноманітні стресові умови, сприяючи їх виживанню і продуктивності.

Отже, **метою** дипломної роботи є біокаталітичний синтез 12-ОФДК та визначення її антимікробних та цитотоксичних властивостей, а також здатності відновлювати рослини від стресу, спричиненого важкими металами.

Об'єкт дослідження – 12-оксофітодієнова (12-ОФДК)

Предмет дослідження – біокаталітичний синтез 12-ОФДК, біологічні (антимікробні, регенеруючі, цитотоксичні) властивості одержаної сполуки

Для досягнення мети були поставлені наступні **завдання**:

1. Зробити літературний огляд біосинтетичного шляху утворення 12-ОФДК та інших жасмонатів в хлоропластах рослин та підходів до лабораторного синтезу цільової сполуки

2. Опанувати протокол біокаталітичного синтезу 12-ОФДК, що складається з трьох послідовних реакцій в одній колбі за використання генетично модифікованого цілюноклітинного каталізатора

3. Провести дослідження на антимікробні властивості 12-ОФДК на тест культурах грампозитивної, грамнегативної бактерій та умовно-патогенних дріжджів.

4. Провести цитотоксичне і генотоксичне дослідження за методом *Alium sera* по відновленню клітин корінців цибулі у умовах кадмієвого стресу за обробки розчином 12-ОФДК.

5. Зробити економічні розрахунки по стартап-проекті біокаталітичного синтезу 12- ОФДК

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1 12-оксофітодієнова кислота

1.1.2. Жасмонова кислота в природі та її метаболітичний шлях в рослинах

Жасмонова кислота- органічна сполука, що міститься в кількох рослинах, включаючи жасмин. Належить до рослинних гормонів із класу жасмонатів. Вона біосинтезується з ліноленової кислоти октадеканоїдним шляхом . Вперше була виділена у 1957 році як метиловий ефір жасмонової кислоти швейцарським хіміком Едуардом Демолем та його колегами. Відомим прикладом рослинних гормонів є (-)-жасмонова кислота ((-)-JA) та її похідні. Оксіліпіни є сигнальними молекулами в рослинах, які регулюють реакції на стрес. Вони утворюються внаслідок оксигенації поліненасичених жирних кислот. Серед оксіліпінів значний інтерес викликає цис-(+)-12-оксофітодієнова кислота (цис-(+)-12-ОФДК), яка має широке застосування в різних галузях. Згідно з останніми дослідженнями, біологічна роль 12-ОФДК полягає не лише в тому, що вона виступає як рослинний гормон, але й у її фармакологічній активності щодо клітин ссавців. Крім того, вона є важливим біосинтетичним проміжним продуктом для синтезу (-)-жасмонової кислоти та її похідних, які сукупно називають "жасмонатами". Жасмонати є біологічно активними оксіліпінами, які беруть участь у захисті рослин від патогенів, механічних ушкоджень, надлишку світла та інших стресів, а також регулюють ріст рослин. Ці сполуки здатні активувати гени, відповідальні за стійкість до патогенів і шкідників, а також за синтез запасних білків рослин. Жасмонат має два хіральні центри в положеннях C3 і C7 (рис. 1.1.1), що дозволяє йому існувати в чотирьох ізомерах. (+)- та (-)-жасмонова кислота зазвичай перебувають у стабільній транс-конфігурації, тоді як цис-конфігурація схильна до епімеризації через кето-єнольну таутомерію для положень C6 і C7. [1].

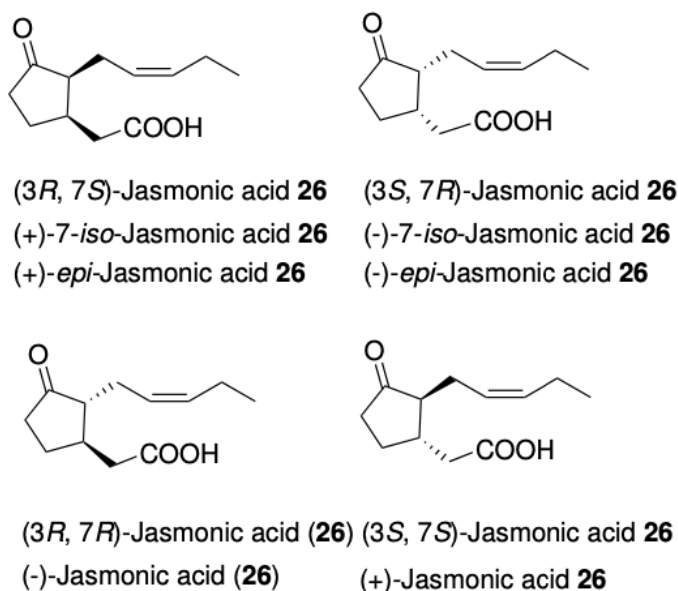


Рис. 1.1.1 — Ізомери ясмонової кислоти

Синтез (-)-ясмонової кислоти в рослинах починається з вивільнення ліноленої кислоти з фосфоліпідів або гліцероліпідів у мембрані хлоропласту, що здійснюється за допомогою ферментів ацилгідроксилаз. Ліноленова кислота далі перетворюється на 13-гідроперокси-9,11,15-октадекатрієнову кислоту (13-ГПОТ) за участю 13-ліпооксигенази (13-ЛОГ). Потім 13-ГПОТ перетворюється на нестабільну (13*S*)-12,13-епокси-октадекатрієнову кислоту (12,13-ЕОТ) завдяки алленоксидсинтазі (AOS), а ця сполука швидко розпадається на рацемічну 12-ОФДК і α - та γ -кетони. Алленоксидциклаза каталізує циклізацію 4, утворюючи активний проміжний продукт — 12-оксофітодієнову кислоту ((+)-12-ОФДК (1)). [2].

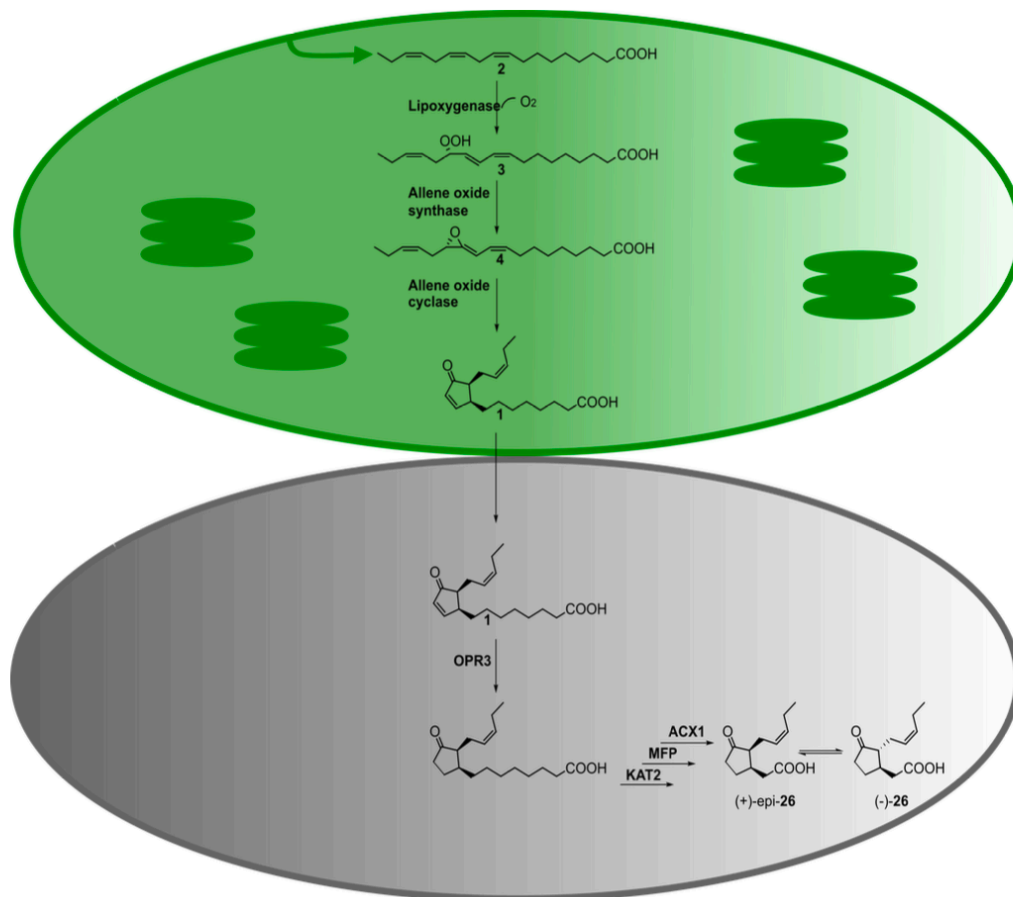


Рис. 1.1.2 — Синтез (-)-ясмонової кислоти (26) в рослина [2].

ЛА 2 гідропероксидування 13-ГПОТ за допомогою 13-ліпооксигенази (ЛОГ), перетворення за допомогою АОС до 12,13-ЕОТ, циклізація до 12-ОФДК за допомогою АОЦ. Інтермедіат транспортується до пероксисом, де відновлення OPR3 енредуктазою з наступним β -окисненням та ізомеризацією до активного (+)- або (-)-JA (26 Рис. 1.1.2).

12-ОФДК транспортується через зовнішню мембрану хлоропласту за допомогою білка JASSY, який, ймовірно, розпізнає 12-ОФДК через домен START, що зустрічається у багатьох ліпід-зв'язуючих білках рослин і людини та відповідає за розпізнавання гідрофобних молекул. Імпорт до пероксисоми відбувається через АТФ-залежний АВС-транспорт (CTS) або механізм іонного захоплення. [3].

У пероксисомі 12-ОФДК відновлюється за допомогою ОФДК-редуктази (OPR3), після чого проходить три цикли β -окиснення, перетворюючись на (+)-7-

ізо-ЖА , який згодом ізомеризується у (-)-ЖА. (-)-Жасмонова кислота є не лише важливим рослинним гормоном, а й популярним інгредієнтом у парфумерії, де її застосовують у формі метилясмонової кислоти (гедіону). Ці ліпідні похідні мають велике наукове значення, допомагаючи краще зрозуміти реакції рослин на зовнішні подразники, і водночас відіграють важливу роль у повсякденному житті людини. [4].

1.1.2 Підходи до синтезу 12-ОФДК. Історичний еккурс

Циммерман і Фен у 1978 році уперше описали синтез 12-ОФДК шляхом інкубації ліноленової кислоти з екстрактом лляного порошку в ацетоні. Приблизно дев'ять років потому ці ж автори досліджували фізіологічну роль 12-ОФДК у регенеративних процесах для шкіри та м'язів людини. Біосинтез цієї сполуки ініціюється активними формами кисню (АФК), пошкодженням листя або гіперчутливою реакцією. 12-ОФДК характеризується наявністю циклопентенового кільця, заміщеного аліфатичним ланцюгом у положенні С3 та алкеновим ланцюгом у положенні С2 (Рис. 1.1.3.) [5].

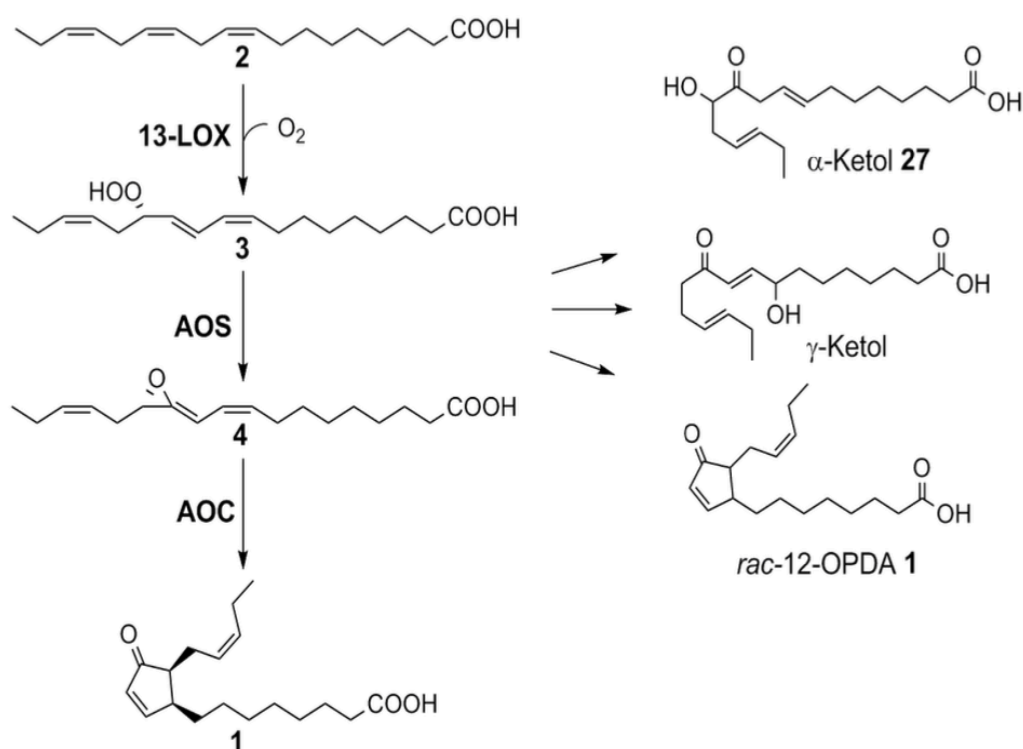


Рис. 1.1.3 — Синтез 12-ОФДК в рослинах. ЛА 2 гідропероксидавання 13-ГПОТ (3) за допомогою 13-ЛОГ, перетворення за допомогою АОС до

12,13-ЕОТ (4), циклізація до 12-ОФДК за допомогою АОС. Розкладання 12,13-ЕОТ (4) на α -кетол 27, γ -кетол 27 і *rac*-12-ОФДК.

Структура 12-ОФДК має значну схожість із простагландинами тварин (Рис. 1.1.4.). Простагландини, які є медіаторами запалення, утворюються в клітинах ссавців з арахідонової кислоти, що вивільняється з плазматичної мембрани фосфоліпазами. Потім ця кислота піддається дії простагландинсинтази G7H або циклооксигенази (COX) та активно продукується під час запальних реакцій. У рослин не лише (-)-ясмонова кислота відповідає за регуляцію генів, але й сам 12-ОФДК може активувати регуляторні гени. Наприклад, 12-ОФДК взаємодіє з циклофіліном 20-3 (Сур 20-3), біфункціональним ферментом у хлоропластах, який має як пептидилпролізіомеразну, так і редуктазну активність. Зв'язування 12-ОФДК з Сур 20-3 сприяє формуванню комплексу із серин-ацетилтрансферазою 1 (SAT1), який, у свою чергу, взаємодіє з О-ацетилсерин(тіол)ліазою В, утворюючи синтазний комплекс цистеїну (CSC). Цей комплекс індукує синтез цистеїну, підвищує редукційний потенціал клітин та регулює експресію генів, чутливих до 12-ОФДК. Таким чином, 12-ОФДК відіграє важливу роль у захисних

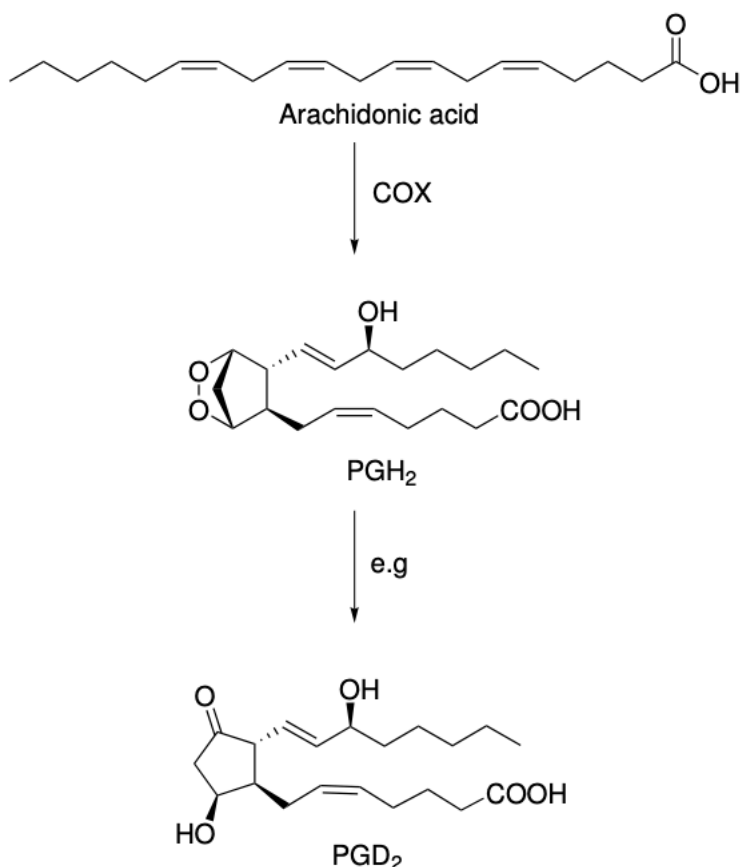


Рис. 1.1.4 Синтез простагландинів, починаючи з арахідонової кислоти і наступному перетворенню циклооксигеназою

Для отримання 12-ОФДК використовують як хімічні, так і ферментативні методи. Один із хімічних способів передбачає використання похідного норборнену, яке піддається діастереоселективному введенню бічного ланцюга та реакції ретро-Дільса-Альдера (Рис. 1.1.5.). Інші методи включають синтез із циклопент-2-енольного енантіомеру або прохірального циклопентен-2-ілхлориду. Наприклад, Нонака та колеги отримали 12-ОФДК після 10 стадій синтезу, використовуючи циклопент-2-еноль. Ернст із колегами розробили метод із використанням прохірального циклопентен-2-ілхлориду.

Перший ферментативний підхід до синтезу 12-ОФДК був описаний Циммерманом і Феном у 1978 році з використанням ліноленової кислоти та екстракту льону. У 1996 році Лаудерт із колегами використали комбінацію

ліпооксигенази із сої, алленоксидсинтази *Arabidopsis thaliana* та алленоксидциклази *Solanum tuberosum* для синтезу 12-ОФДК. Вони зв'язали AOS і AOC на тверду матрицю, що дозволило синтезувати 12-ОФДК з 13-ГПОТ. У 2007 році Зербе зі співавторами використали іммобілізовані алленоксидсинтазу та алленоксидциклазу разом із 13-ГПОТ, отриманою за допомогою ліпооксигенази сої. Інші підходи включають використання комерційно доступних ферментів або їх рекомбінантних форм. Наприклад, Мейнард та колеги комбінували ліпооксигеназу з *Glycine max* із рекомбінантними AOS та AOC із *Arabidopsis thaliana* у формі сирого лізату [7].

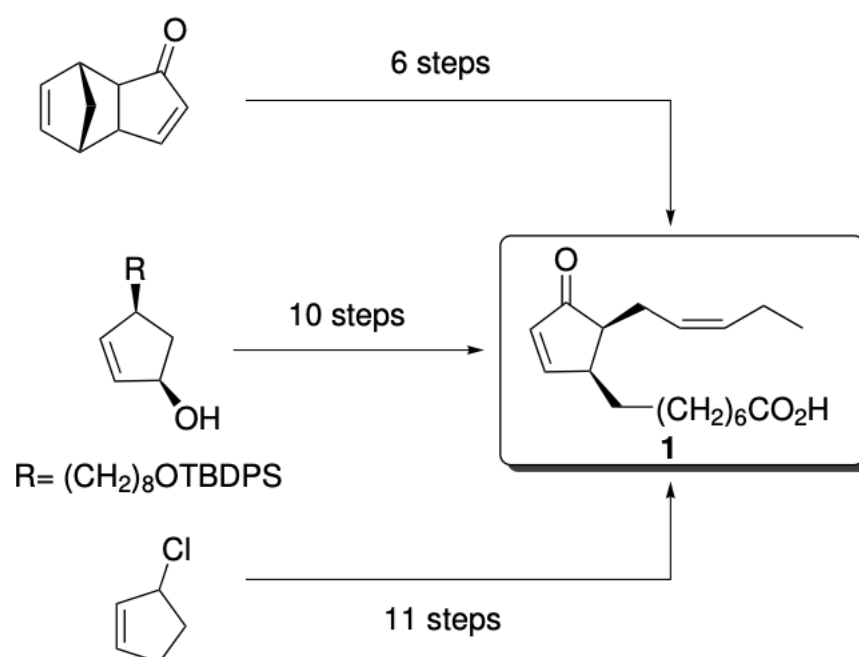


Рис. 1.1.5. Синтез 12-ОФДК, починаючи з похідного норборнену, циклопент-2-енольного енантіомеру, або прохірального циклопентен-2-ілхлориду

Починаючи з 1979 року, коли Вік та Циммерманн уперше описали цей біокаталітичний каскад *in vitro*, основні дослідження спрямовувалися на оптимізацію отримання 12-ОФДК. У 2020 році групи Дітца та Грегера розробили перший практичний однокроковий біокаталітичний процес для синтезу 12-ОФДК із використанням комерційно доступної 13-ЛОГ із *Glycine max* та рекомбінантного AOC із *Arabidopsis thaliana*. Незважаючи на повну конверсію субстрату при завантаженні до 2 г/л та високу стереоселективність (>99%

енантіомерна чистота), процес мав обмеження, зокрема утворення побічних продуктів (до 10%) та ізомеризацію цільового продукту.

У цьому дослідженні було суттєво вдосконалено біопроцес, збільшивши завантаження субстрату до 10–20 г/л із високою конверсією та стереоселективністю. Оптимізація шляху включала модифікацію біокаталізатора та реакційних параметрів, що дозволило повністю уникнути побічних реакцій та забезпечити сталий процес очищення. Крім того, розроблено масштабоване виробництво біокаталізатора в умовах високощільної ферментації.

1.2 Мета дослідження біокаталітичного синтезу 12- ОФДК

Порівняння хімічного та ензиматичного методів отримання 12-ОФДК показує, що хімічні шляхи значно складніші. Традиційна органічна хімія природних сполук переважно базується на формуванні 5-членного кільця та подальшій функціоналізації. Проте такі маршрути вимагають багатоступеневого синтезу з численними етапами ізоляції проміжних продуктів, що призводить до низького загального виходу та значного утворення відходів. Таким чином, ці методи є непрактичними навіть для синтезу в масштабах грамів і тим більше для технічного виробництва. Біокаталітичний підхід у природі, на відміну від хімічного, починається з ненасиченої жирної кислоти, за якою слідує триступеневий ензиматичний синтез. Використовуючи ензиматичний каскад як початкову точку для синтезу 12-ОФДК, наразі вдалося ізолювати лише кілька мг продукту. Зважаючи на фармакологічну та сільськогосподарську значимість 12-ОФДК, особливо важливо зрозуміти природний синтез цієї сполуки, а також здійснити її ензиматичний синтез у масштабі 1-2 грамів [8].

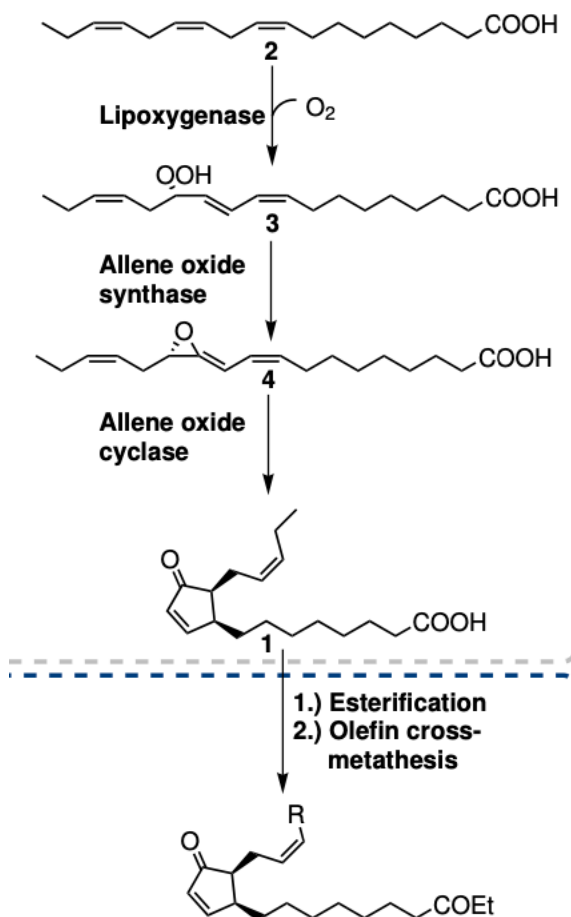


Рис. 1.2.1. Вміст синтезу 12-ОФДК у тристадійній ферментативній каскадній реакції з ліпоксигеназою аленоксидсинтази і циклази. Подальше перетворення 12-ОФДК, починаючи з естерифікації з подальшим перехресним метатезисом олефінів.

Значний інтерес у можливості отримання продукту у більшому масштабі та з високою чистотою за спрощення умов реакції. Для цього необхідно охарактеризувати ферменти та зрозуміти окремі етапи процесу. У майбутньому цей підхід буде застосований у сегментованому потоці, щоб оптимізувати відтворюваність і контроль реакції [9].

Для створення бібліотеки похідних 12-ОФДК використовувалась стратегія алкен-крос-метатезу (СМ), як м'якого і керованого процесу, що раніше застосовувався для дериватизації (-)-ясмонової кислоти та простагландинів. Тому ця методика була використана для розширення класу молекул 12-ОФДК та створення нової, різноманітної бібліотеки. Тому було проведено скринінг

різноманітних олефінів, а також вибір оптимальних розчинника, температури та каталізатора для реакції [10].

1.3 Опис синтезу та його оптимізація

Синтез 12-ОФДК у високій чистоті та відносно великих масштабах є критичним етапом для подальших досліджень її біологічної активності, зокрема впливу на експресію генів і взаємодію з іншими біологічно активними молекулами. Оскільки біосинтетичний каскад 12-ОФДК складається з трьох основних стадій, кожен з них потребує ретельного дослідження. Перший крок дослідження полягав у перевірці літературних даних щодо отримання 13-ГПОТ, першого проміжного продукту (рис. 1.3.1).

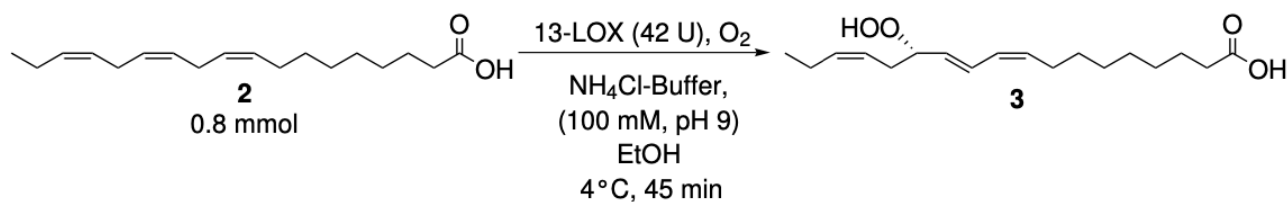


Рис.1.3.1. Синтез 13-ГПОТ із ліноленової кислоти за допомогою 13-ліпооксигенази із сої як каталізатора.

На початковому етапі активність 13-ЛОГ підтверджували за допомогою спектрофотометричного аналізу, щоб визначити оптимальні умови реакції. Для цього ліноленову кислоту розчиняли в дегазованому етанолі, після чого додавали амоній-хлоридний буфер (100 mM, pH 9). Використовували комерційну ліпооксигеназу із сої *Glycine max* (Sigma Aldrich L7395, тип I-B, ліофілізований порошок), а саму реакцію проводили за температури 4 °C. Хід реакції контролювали за допомогою тонкошарової хроматографії (елуент: циклогексан/етилацетат/оцтова кислота, 3:1:0,1, об/об) і зупиняли через 30 хвилин. При цьому вихід продукту становив лише 20%, а реакція вимагала значної кількості ферменту, що стало основою для подальшої оптимізації.

Для початку було проведено тест активності ферменту, щоб визначити найкращі параметри реакції, включаючи тип буфера, його концентрацію, рН, температуру, а також кількість етанолу. [11].

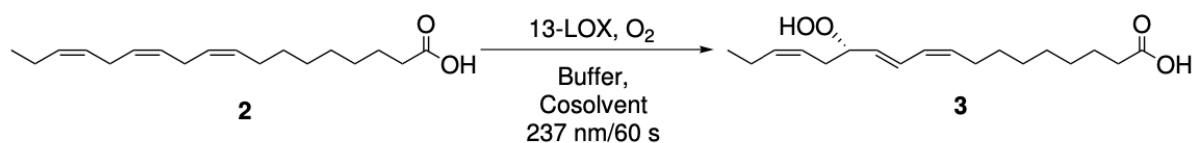


Рис 1.3.2 Синтез використовуючи 13-ЛОГ із сої як каталізатор

Найвищу ефективність реакції отримали при використанні буфера NH₄Cl із концентрацією 100 мМ, рН 9, температурі 30–35 °С та додаванні 5% етанолу. Збільшення концентрації буфера позитивно впливало на вихід продукту, що, ймовірно, пояснюється зменшенням коливань рН або стабілізаційною дією солей. Додавання етанолу також покращувало ефективність реакції, забезпечуючи кращу розчинність ліноленової кислоти. Додатково досліджували можливість використання метилових і етилових естерів жирних кислот як субстратів, щоб покращити проникність мембран і полегшити подальше очищення продукту. Для цього метилові та етилові естери синтезували за допомогою метанолу чи етанолу в толуені з соляною кислотою за температури 4 °С. Метиловий естер отримали з виходом 98%, тоді як етиловий — лише з виходом 58%.

У подальшому ці естери тестували як субстрати для 13-ЛОГ із Glycine max. Однак результати спектрофотометричного аналізу показали низьку активність ферменту з естерами, що підкреслює важливість високого рН для ефективності 13-ЛОГ. Імовірно, взаємодія карбоксильних груп субстрату з позитивно зарядженим аргініном у активному центрі ферменту є ключовою для його каталітичної активності. [12].

Оскільки 13-ГПОТ є критичним проміжним продуктом у синтезі 12-ОФДК, вивчення його стабільності та поведінки мало велике значення. Дослідження біокаталітичного синтезу за допомогою 13-ЛОГ показали, що

подача кисню є важливим фактором. У літературі не повідомлялося про вплив додаткового кисню, тому цей аспект став одним із напрямків подальшого вивчення.

Для цього реакції проводили в декількох умовах. У варіанті А реакція проходила у відкритій колбі без додаткового насичення киснем. У варіантах В і С реакцію проводили з насиченням киснем під час процесу, використовуючи кисневу кульку. У варіантах D і E кисень насичували до і під час реакції. Результати показали, що додаткове насичення киснем значно підвищує вихід продукту, скорочуючи час реакції. Це також зменшує кількість побічних продуктів, що підтверджено за допомогою ^1H ЯМР-спектроскопії, і дозволяє ізолювати більший обсяг цільового продукту. [13].

1.4 Синтез 12-ОФДК

1.4.1 Протонно-ЯМР-спектроскопічний аналіз для синтезу 12-ОФДК

Під час синтезу 12-ОФДК за допомогою протонно-ЯМР-спектроскопії було здійснено моніторинг конверсії, цис-транс-ізомеризації та утворення побічних продуктів, зіставляючи конкретні сигнали.

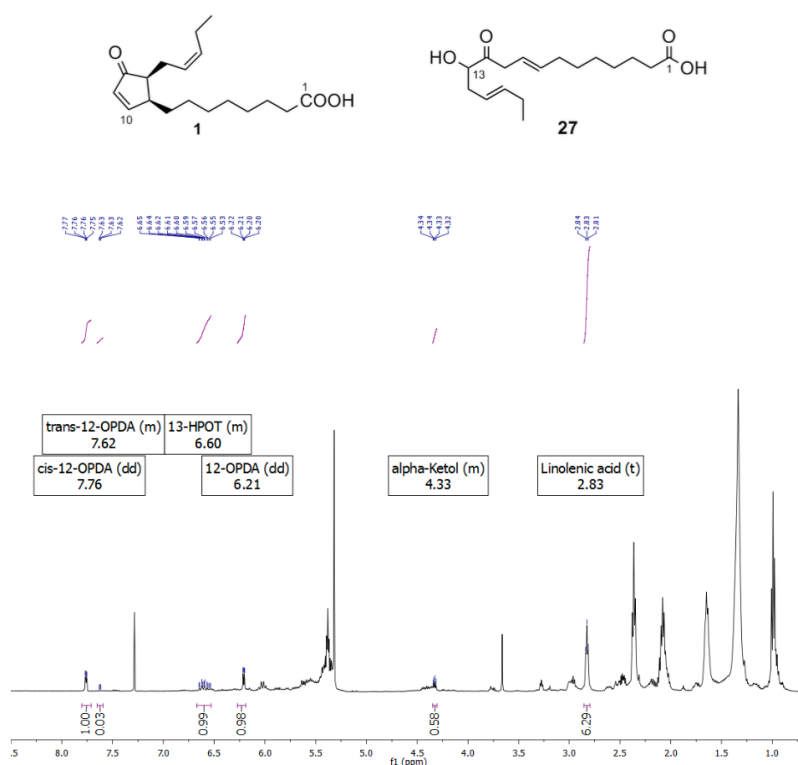


Рис 1.4.1. Приклад реакції на 12-ОФДК, показаний у 1Н ЯМР-спектрі

На малюнку показаний 1Н ЯМР-спектр неочищеного продукту 12-ОФДК. Детально 1Н ЯМР-спектр показує побічний продукт α -кетол 27, цис-12-ОФДК, транс-12-ОФДК, ліноленову кислоту і 13-НРОТ. Співвідношення цис:транс можна визначити шляхом порівняння сигналів при 7,76 і 7,62 м.д. Ці сигнали спричинені цис (7,76 м.д., (C10)H) або транс (7,62 м.д., (C10)H) протоном [14].

1.4.2. Початкові експерименти для синтезу 12-ОФДК

Після успішного виробництва цілюноклітинного каталізатора було проведено власне синтез цільового 12-ОФДК. Для цього було підготовлено реакційну суміш, що містить α -ліноленову кислоту (3 мМ, 2), 13-ЛОГ (3 мг, 40 U) та цілюноклітинний каталізатор (400 мг, *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus-RIL трансформованого генами pET24a(+)-AtAOS, pQE30-AtAOC2 (WCC1)) в у 100 мл амоній-хлоридного буфера (100 мМ, рН 9, 5% етанолу) при температурі 4°C. На відміну від результатів активності ферментів, температуру реакції було встановлено на рівні 4°C, виходячи з припущення, що продукт 1 є нестабільним. Реакцію контролювали за допомогою тонкошарової хроматографії (ТШХ) (3/1/0.05; циклогексан/етилацетат/оцтова кислота, об/об/об). Через 2 години α -ліноленову кислоту не було виявлено. Реакцію зупинили, додавши 2 М хлоридну кислоту. Реакційну суміш екстрагували за допомогою МТВЕ. Сирий продукт було проаналізовано методом протонної ЯМР-спектроскопії. [15]

У спектрі 1Н-ЯМР представлено характерні сигнали для 12-ОФДК. На 7,74 ppm і 6,18 ppm відображено два дублети дублетів, спричинені протонами (C10)H та (C11)H у складі 12-ОФДК. Ці два сигнали є характерними і не з'являються в спектрі жодного з проміжних або побічних продуктів. Основний побічний продукт також представлено в спектрі 1Н-ЯМР і характеризується триплетом на 4,30 ppm і мультиплетом на 3,24 ppm. Обидва сигнали спричинені розпадом 12,13-ЕОТ до α -кетолу 27. Протон (C13)H α -кетолу розщеплюється на триплет на 4,30 ppm. Два протони на позиції (C11)H α -кетолу формують мультиплет на

3,24 ppm. Багато сигналів, викликаних іншими протонами з 12-ОФДК і α -кетолу, накладаються один на одного. Оскільки основний побічний продукт і 12-ОФДК мають відмінні сигнали в спектрі ^1H -ЯМР, співвідношення можна обчислити, порівнюючи протон (C11)H α -кетолу 27 на 4,30 ppm з протонами (C10)H та (C11)H на 7,74 ppm або 6,18 ppm з 12-ОФДК. [16]

Для цієї реакції було отримано співвідношення 40:60 для 12-ОФДК та α -кетолу (Рис 1.4.2). Підвищивши кількість цільноклітинного каталізатора з 400 мг до 1000 мг, співвідношення вдалося знизити до 95:5. Ці результати свідчать, що каскадний процес придатний для синтезу 12-ОФДК.

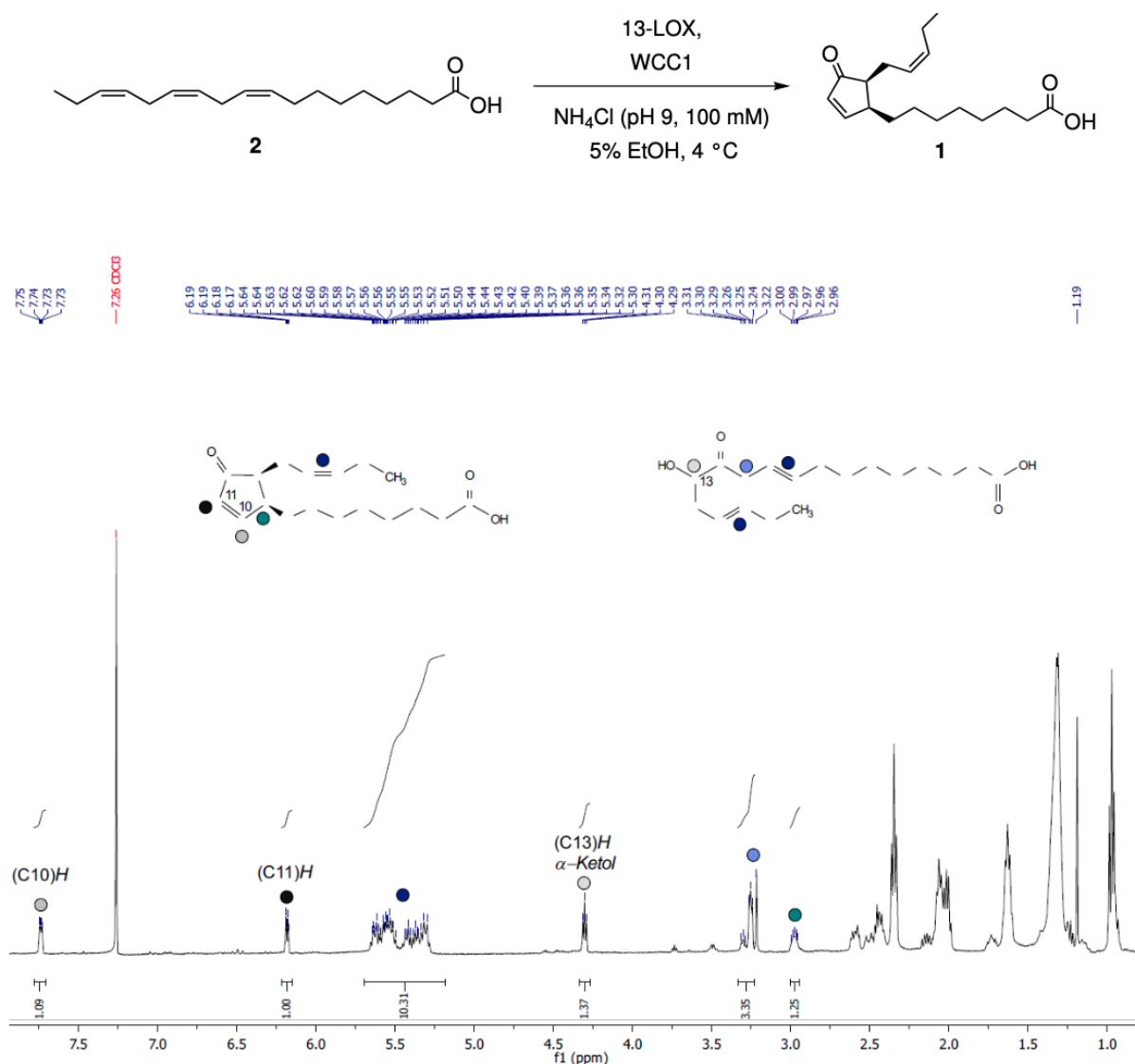


Рис 1.4.2. ^1H -ЯМР-спектр 12-ОФДК і α -кетол (суміш 40:60)

Крім того, було встановлено метод очищення за допомогою колонки C18 для автоматичної системи очищення Isolera One від Biotage з ацетонітрилом та

водою з 1% оцтової кислоти (об/об) як рухомою фазою. Хроматограма показує два піки (зелений і синій) з підвищенням вмісту ацетонітрилу приблизно до 60%. Зелений пік представляє α -кетол, а синій пік – 12-ОФДК (рис 1.4.3) [17]

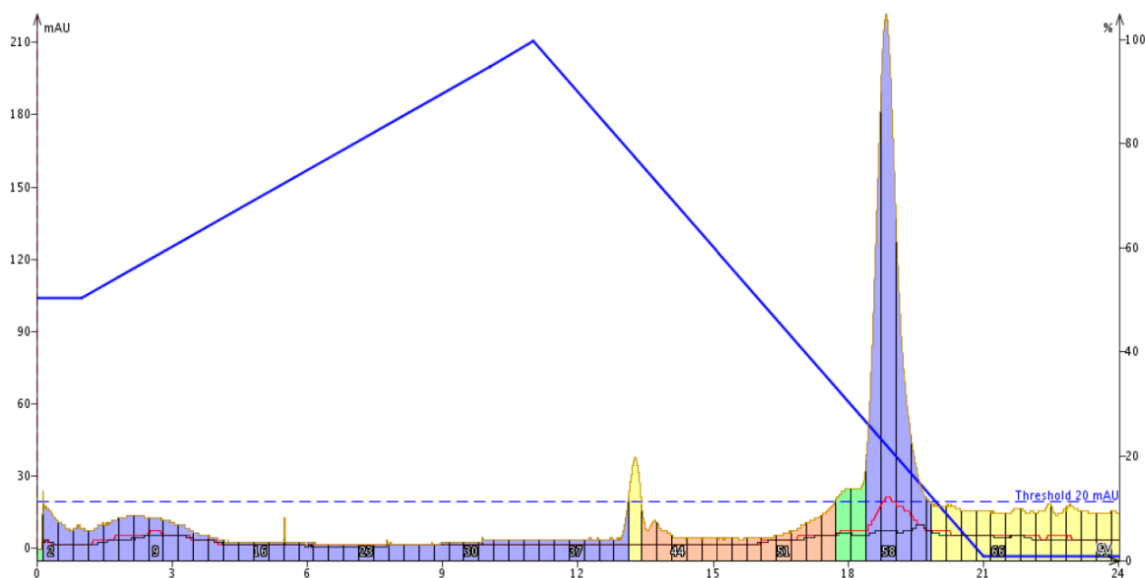


Рис 1.4.3. Хроматограма суміші 12-ОФДК і α -кетол, очищеної за допомогою Isolera One від Biotage.

1.4.3 Синтез 12-ОФДК із власним біокаталізатором

Оцінюючи параметри для створення ефективного цільноклітинного каталізатора, було розглянуто вектори, послідовності транспортування до хлоропластів та оптимізацію кодонів для *E. coli*. З'ясувалося, що оптимізація кодонів для генів AtAOC і AtAOS може знижувати активність ферментів, імовірно, через неправильне згортання білків, попри покращену надекспресію. Крім того, ферменти проявляли активність лише за умови видалення послідовностей транспортування до хлоропластів. У результаті було отримано гени дикого типу AtAOS та AtAOC без цих послідовностей та включено їх у вектори pET28a(+) (AtAOS) і pET21a(+) (AtAOC2). Для додаткового тестування AtAOC2 також було клоновано у вектори pUC18 (WCC 2) та pQE30 (WCC 3)

Під час досліджень було встановлено, що продукт реакції зберігає стабільність тривалий час, що дозволило підвищити температуру реакції до

кімнатної для посилення активності AOS і ліпооксигенази (ЛОГ). Для зменшення витрат каталізатора кількість WCC було оптимізовано до 300 мг. Конструкти трансформували у штами *E. coli* BL21(DE3) та BL21(DE3)CodonPlus-RIL, де вони експресувалися для подальшої біотрансформації. Реакції проводили у потоковому режимі (Рис. 1.4.4, 1.4.5), починаючи з використання окремих клітин, що експресували AtAOS та AtAOC2 (pET28a-AtAOS та pET21a-AtAOC2), у комбінації з комерційно доступною 13-ЛОГ із сої. Реакцію здійснювали при кімнатній температурі в кисневому середовищі з буфером на основі хлориду амонію (pH 9) та 5% етанолу для покращення розчинності α -ліноленової кислоти. Це забезпечило конверсію з отриманням 69% основного продукту 12-ОФДК та 31% побічного продукту. [18].

У наступних експериментах застосовували цільноклітинні каталізатори WCC 2 і WCC 3, які дозволяли зменшити утворення побічного продукту до 10% у разі використання AtAOC2 у pQE30 (WCC 3). За допомогою автоматичної хроматографії на колонці зворотної фази вихід цільового продукту становив 61%. Використання AtAOC2 показало, що цей фермент критично необхідний для отримання енантімерно чистого 12-ОФДК.

Оптимізація екстракції включала три методики: центрифугування з подальшою екстракцією дихлорметаном, ультразвукову обробку осаду, та екстракцію за методом Бліга і Дайєра. Ультразвукова обробка дозволила подвоїти вихід продукту до 61%, підтвердивши важливість цього підходу.

У рамках масштабування процесу було досягнуто концентрації 2 г/л 12-ОФДК з селективністю 91% та співвідношенням цис:транс 95:5, проте загальний вихід залишався обмеженим. Це стимулювало подальший пошук ефективних методів доопрацювання, таких як осадження чи використання іонних обмінників. [19].

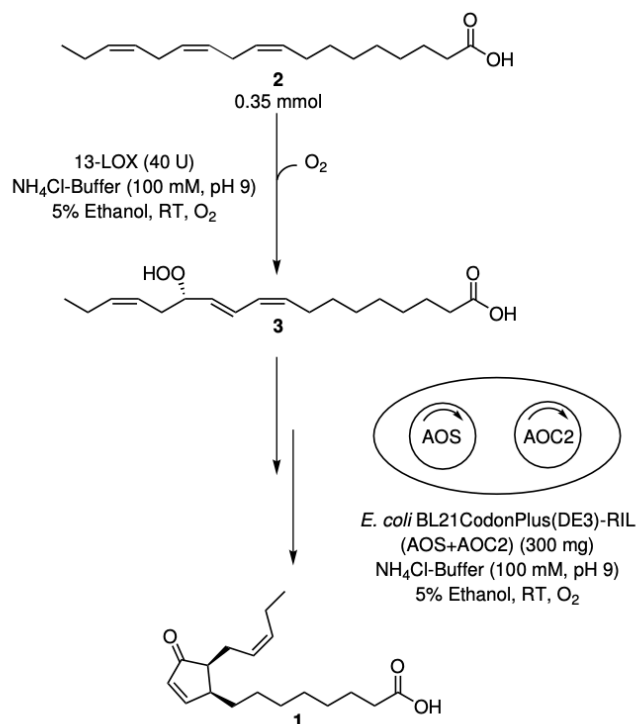


Рис. 1.4.4. Синтез 12-ОФДК, починаючи з ліноленової кислоти, 13-ЛОГ і AtAOS і AtAOC в одному реакторі

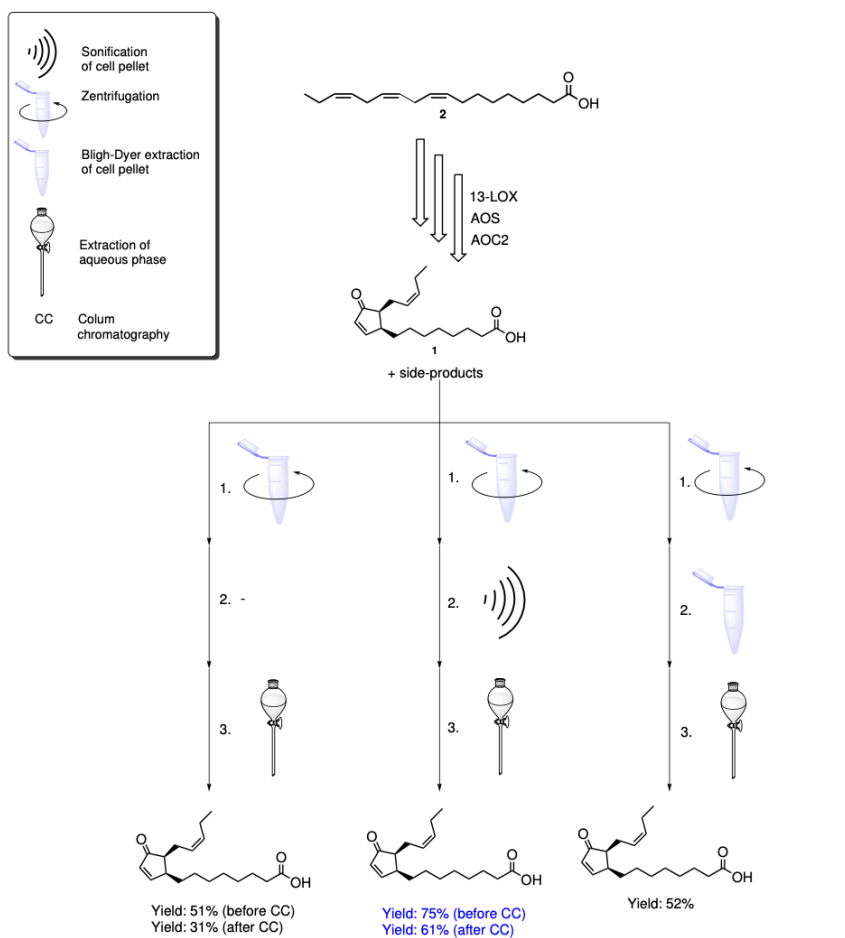


Рис. 1.4.5. Синтез 12-ОФДК (1), починаючи з ліноленової кислоти (2), 13-ЛОГ і AtAOS і AtAOC2 в одній цілій клітині.

1.4.4 Синтез 12-ОФДК в потоці

В хімічній технології наділяють великими перспективами хімічні реакції у безперервному потоці. Використання системи безперервного синтезу має численні переваги, зокрема покращену масопередачу та теплопередачу, високу відтворюваність, автоматизацію, підвищену безпеку, просту масштабованість тощо. Проточна хімія також набуває популярності у галузі біокаталізу. У літературі вже описано багато прикладів, наприклад, синтез амінів за допомогою іммобілізованої трансамінази з *Halomonas elongata* або виробництво фенілсерину за допомогою треонінальдолази, іммобілізованої на акрилових мікрочастинках Eupergit. Крім того, можуть використовуватися неіммобілізовані ферменти, як, наприклад, алкогольдегідрогеназа для окислення гексанолу [20].

У ферментативних реакціях з низькою розчинністю субстрату, а також з обмеженнями масопередачі, двофазні реакційні розчини показують велику перевагу, забезпечуючи високе навантаження та запобігаючи деактивації ферментів. Для вирішення проблем деактивації ферментів можна застосувати системи сегментованого потоку. У сегментованому потоці водні та органічні фази поділяються на дрібні краплі, які не змішуються (Рис 1.4.6.). Існують також приклади застосування сегментованого потоку в поєднанні з ферментами, такі як перетворення 1-гептальдегіду на 1-гептанол у капілярному мікрореакторі із сегментованим потоком або перетворення ацетофенону та трифлуорацетофенону на відповідні спирти за допомогою алкогольдегідрогеназ [21].

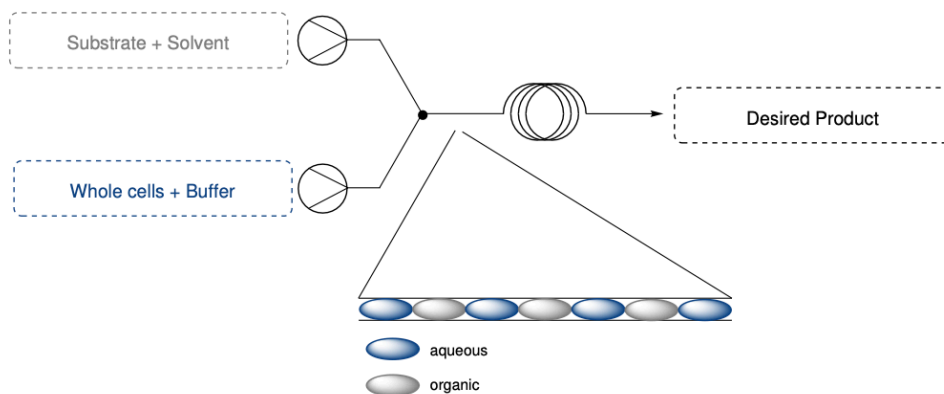


Рис 1.4.6. Схематична схема сегментованого потоку для реакції цілих клітин у буфері та субстраті в розчиннику.

Ця технологія реакції застосована у проєкті 12-ОФДК у співпраці з кафедрою промислової органічної хімії та біотехнології Університету Білефельда. Спочатку 13-ГПОТ синтезовано в партійному режимі, що є необхідним для цієї реакції. Реакція буде проводитися в сегментованому потоці з цілими клітинами, що містять AtAOC і AtAOЦ, у буфері з органічною фазою, яка складається з органічного розчинника та субстрату. Спочатку, як уже згадувалося, був синтезований 13-ГПОТ, який отримали з виходом 83% (Рис 1.4.7.).

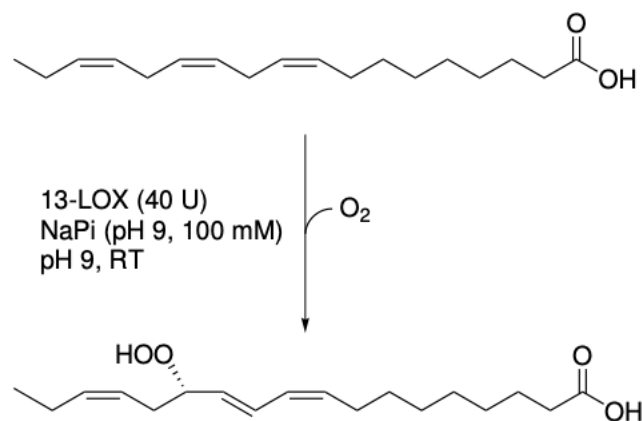


Рис 1.4.7. Синтез 13-ГПОТ, починаючи з ліноленової кислоти і 13-ЛОГ

Після отримання вихідного матеріалу було проведено скринінг розчинників для органічної фази, досліджуючи оптимальний буфер і найкращу систему розчинників. Ці реакції проводилися в партійному режимі в об'ємі 2 мл із 30 мг/мл вологих клітин. Найбільш підходящими буферами були фосфатний

буфер натрію з рН=8 та хлорид амонію з рН=9. Найбільш підходящим розчинником виявився ізооктан. Крім того, циклогексан з додаванням 10% МТВЕ, а також додавання Tween 20 (1%, м/об) показали хороші результати. [22].

На наступному етапі кількість каталізатора з цілих клітин було зменшено з 30 до 10 або 20 мг/мл. Зменшення кількості цілих клітин призвело до значного зниження конверсії. Додавання Tween 20 (1%, м/об) не призвело до суттєвих змін конверсії з ізооктаном як косолвентом. Найкраще перетворення в серійній реакції було досягнуто з 20 мг/мл цілих клітин з Tween 20 (1%, об/об) і ізооктаном — 34% (Рис1.4.8).

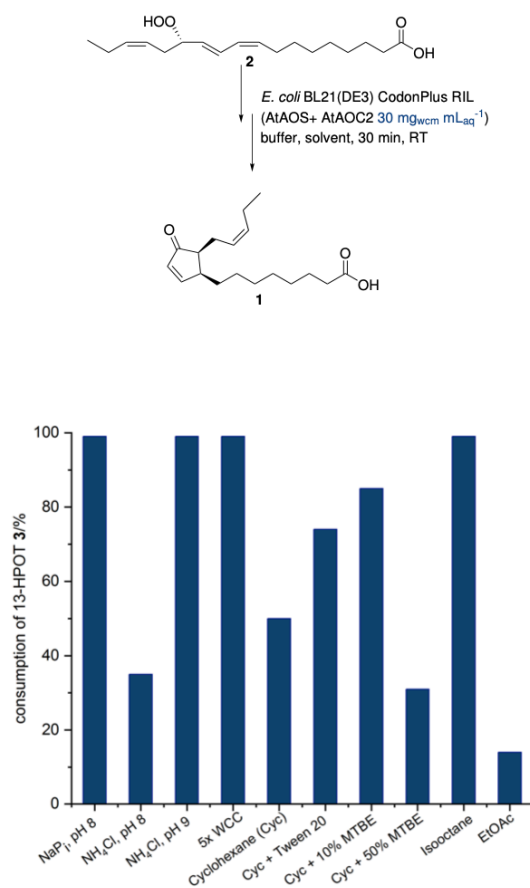


Рис 1.4.8. Синтез 12-ОФДК, починаючи з 13-ГПОТ (з 30 mg_{wcm} mL⁻¹ цілих клітин) - Сус: циклогексан, Tween 20 (1%, м/V), 5x WCC у NaPi, рН 8

Для застосування синтезу 12-ОФДК в проточному режимі були використані ті ж умови реакції. Також було досліджено зберігання зібраних клітин, які зберігали при 4°C та -20°C, після чого проводили реакцію. У клітинах,

збережених при 4°C, активність збереглася, тоді як при -20°C активність втрачалась, імовірно, через руйнування клітинної мембрани під час заморожування, що призводить до прямого контакту органічного розчинника з ферментом та його денатурації. Тому клітини зберігали при 4°C для подальших експериментів [23].

Згідно з оптимізованими умовами для партії, було проведено реакцію у проточному режимі. 13-ГПОТ був розчинений в ізооктані, а каталізатор (AtAOC та AtАОЦ у *E. coli* BL21CodonPlus(DE3)-RIL 20 мг/мл) розподілено у буфері з Tween 20 (1%, м/об). Дві несумісні розчини переміщували в шприци та поєднували у змішувачі Y-подібної форми. Після початку реакції у безперервному потоці формувалися рівномірні сегменти. Ці сегменти направлялися до PFE котушкового реактора, де проводилася біотрансформація. Потім фракції (1 мл) збирали і негайно припиняли реакцію додаванням 2 мМ хлороводневої кислоти.

1.5 Перспективи біокаталітичного отримання 12-ОФДК

Для каскадного синтезу 12-ОФДК використовували комерційно доступний фермент 13-ЛОГ із сої (*Glycine max*) та рекомбінантні ферменти AtAOC і AtAOS із *Arabidopsis thaliana*. Оптимальні умови для реакцій із 13-ЛОГ включали буфер NH₄Cl із рН 9, температуру 30–35°C і 5% етанолу. Для AtAOS найкращими виявилися умови з буфером NH₄Cl при рН 8 і температурі 20°C. У реакції, каталізованій 13-ЛОГ, ключовими факторами були наявність кисню і висока температура.

Успішно створено цілюноклітинний каталізатор, що включає AtAOC у плазміді pQE30 і AtAOS у плазміді pET28a. Такий підхід дозволив зменшити утворення побічного продукту до 5–10% та провести масштабні експерименти, отримавши концентрацію 2 г/л 12-ОФДК. Для видалення побічного продукту (α -кетолу) використовували автоматичну хроматографію з оберненою фазою.

Проблемним аспектом залишається доопрацювання, адже навіть після оптимізації вдалося виділити лише 61% бажаного продукту. Для вирішення цієї проблеми можна розглянути методи осадження продукту або використання іонообмінних смол.

Протокові реакції виявилися більш ефективними за партійні завдяки кращому масопереносу в умовах сегментованого потоку. Зокрема, ізооктан із Tween 20 забезпечили високий вихід продукту з мінімальною кількістю побічних компонентів. Для подальших експериментів варто протестувати можливість синтезу 13-ГПОТ у проточному режимі.

У підсумку, використання біокаталітичного каскадного підходу та інноваційних технологій у синтезі 12-ОФДК відкриває нові перспективи для отримання продуктів із високою селективністю та економічною ефективністю. Перспективними напрямками майбутніх досліджень у сфері біокаталітичного синтезу 12-ОФДК можуть стати масштабування синтезу за допомогою використання проточних мікрореакторів для реакцій із 13-ЛОГ і вивчення взаємодії ферментів у каскадних процесах. Важливим є також впровадження методів для оптимізації кисневої доступності, наприклад, шляхом застосування мембранних систем або технологій типу "трубка в трубці", що забезпечить ефективну доставку кисню до активних зон реакції. Крім того, перспективним є дослідження іммобілізованих форм ферментів, таких як 13-ЛОГ, AtAOC і AtAOS, для підвищення їх стабільності та забезпечення можливості багаторазового використання в біокаталітичних процесах. Підвищення селективності: Модифікація умов реакції та введення інгібіторів побічних продуктів для подальшого зниження утворення небажаних компонентів.

Автоматизація процесу: Інтеграція проточних реакторів із системами автоматичного моніторингу та контролю параметрів для забезпечення стабільної роботи процесу на великих масштабах.

Синтез 12-ОФДК має значний потенціал для використання в різних галузях, зокрема у фармацевтиці, виробництві біополімерів та біопестицидів.

Його отримання з використанням екологічно чистих біокаталітичних методів відповідає принципам зеленої хімії та стійкого розвитку.

Розроблені у ході цього дослідження підходи можуть бути адаптовані для синтезу інших оксофілінів і пов'язаних сполук, розширюючи спектр біокаталітичних технологій у хімічній промисловості. Використання проточних реакцій відкриває нові горизонти для ефективного масштабування та інтеграції цих процесів у існуючі виробничі лінії.

Впровадження цих технологій на практиці сприятиме зниженню виробничих витрат, зменшенню екологічного впливу і підвищенню конкурентоспроможності на ринку високотехнологічних біопродуктів.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ

2.1 Методи проведення експерименту

Дизайн експерименту: 6-денний вплив Cd та 12-денна обробка коренів 12-ОФДК. Експеримент передбачав оцінку впливу оксидативного стресу, викликаного кадмієм (Cd), на меристемі коренів цибулі та подальше відновлення клітин після обробки 12-ОФДК. Спираючись на результати досліджень Arya et al. та Unyayar et al., а також класичний протокол DB-ALM *Allium* Test, для експерименту було обрано CdCl_2 у концентраціях 10 мкМ і 100 мкМ. Як негативний контроль використовувалася дистильована вода. Як позитивний контроль (типовий мутаген у тесті *Allium*), рекомендується використовувати метилметансульфонат. У цьому дослідженні позитивний контроль не включався в експеримент, оскільки він був виконаний раніше в лабораторії, при чому було зафіксовано позитивний високий токсичний ефект у вигляді значного зниження мітотичного індексу та апоптозу клітин.

Цибулини приблизно однакового розміру, без пошкоджень шкідниками чи хворобами, були відібрані для дослідження. Для забезпечення рівномірного проростання кожній цибулині було за допомогою ножа обрізано верхівку бруньки. Тестові розчини наливали у скляні стакани до краю об'ємом 30 мл так, щоб основа цибулини лише торкалася поверхні рідини. Щоб уникнути впливу світла на розчин та корені цибулі, кожен скляний стакан з цибулиною поміщали у паперовий стакан.

Для експериментальної установки було використано по 6 цибулин для кожного з умов: контрольний розчин (дистильована вода) і дві концентрації CdCl_2 (10 мкМ та 100 мкМ) (Рис 2.1). Цибулини пророщували в умовах впливу кадмію протягом 6 днів у лабораторії за температури 20°C при природному освітленні.



Рис 2.1.1. Стаканчики з цибулинами в перевірених розчинах

На сьомий день вимірювали довжину коренів, а також фіксували кінчики коренів для подальшого фарбування та мікроскопічного аналізу. Для цього з кожної рослини відрізали по 3–4 корені. Відновлення клітин після пошкодження, викликаного Cd, починали шляхом перенесення цибулин із розчину Cd у розчин 12-ОФДК. Без попереднього промивання дистильованою водою цибулини поміщали у водно-спиртові розчини 12-ОФДК з концентраціями 10 мкМ, 50 мкМ та 100 мкМ. Враховуючи погану розчинність 12-ОФДК у воді, основний розчин із концентрацією 0,5 М готували в 96% етанолі. Потім із цього розчину готували сильно розведені водні розчини (10 мкМ, 50 мкМ і 100 мкМ). Як контроль у цьому експерименті використовували дистильовану воду з незначним вмістом етанолу. Беручи до уваги кількість цибулин, було вирішено провести такі серії тестів:

- Цибулини, що попередньо зазнали впливу 10 мкМ Cd, обробляли 12-ОФДК у концентраціях 10 мкМ і 50 мкМ, або, для контролю (0 мкМ з незначним вмістом етанолу).

- Цибулини, що попередньо зазнали впливу 100 мкМ Cd, обробляли 12-ОФДК у концентраціях 50 мкМ і 100 мкМ, або, для контролю (0 мкМ з незначним вмістом етанолу).

- Додатково було вивчено вплив 10 мкМ, 50 мкМ та 100 мкМ 12-ОФДК на цибулю, вирощену без Cd у дистильованій воді.

На 4-й і 12-й день обробки 12-ОФДК вимірювали довжину коренів, а кінчики коренів 5-7 мм фіксували для подальшого фарбування, мікроскопіювання і аналізу цитотоксичних параметрів.

Фіксація та фарбування коренів цибулі

Хімічну фіксацію тканин коренів, їх фарбування, підготовку мікропрепаратів і мікроскопічний аналіз проводили відповідно до встановлених процедур [25]. Протягом початкового вирощування 6 днів контрольні корені досягли середньої довжини приблизно 1 см. Їх зрізали, фіксували та залишали на

ніч у холодильнику за температури 4°C у розчині Кларка (2 частини 96% етилового спирту і 1 частина льодяної оцтової кислоти). Потім корені занурювали у 1 М розчин соляної кислоти на 5–6 хвилин. Подальше фарбування проводили в розчині ацетокарміну протягом 60 хвилин. Для приготування розчину ацетокарміну 1 г карміну розчиняли у 100 мл 45% оцтової кислоти, фільтрували та зберігали у темному місці у щільно закритій колбі. Після фарбування корені промивали в 20% оцтовій кислоті протягом 15 хвилин.

Корені витягали з розчину й готували до мікроскопії методом розплющення, щоб отримати клітини з гарною візуалізацією. Для цього кінчик кореня (довжиною 0,5 мм, що складається з меристематичної тканини) розміщували на предметному склі у краплі гліцерину, накривали покривним склом і обережно розплющували, легко натискаючи вертикально на покривне скельце.

2.2 Мікроскопічний аналіз та обчислення цитотоксичних параметрів

Мікроскопічні препарати аналізували, досліджуючи 400–500 клітин для кожної умови, використовуючи оптичний мікроскоп із базовим збільшенням $\times 400$, а в окремих випадках $\times 1000$. Життєздатність клітин оцінювали за станом мембран, цитоплазми, ядра та відсутністю клітинних та хромосомних аномалій. Мітотичний індекс (МІ, %) розраховували як співвідношення кількості клітин у стадії поділу до загальної кількості клітин (включно з клітинами в інтерфазі).

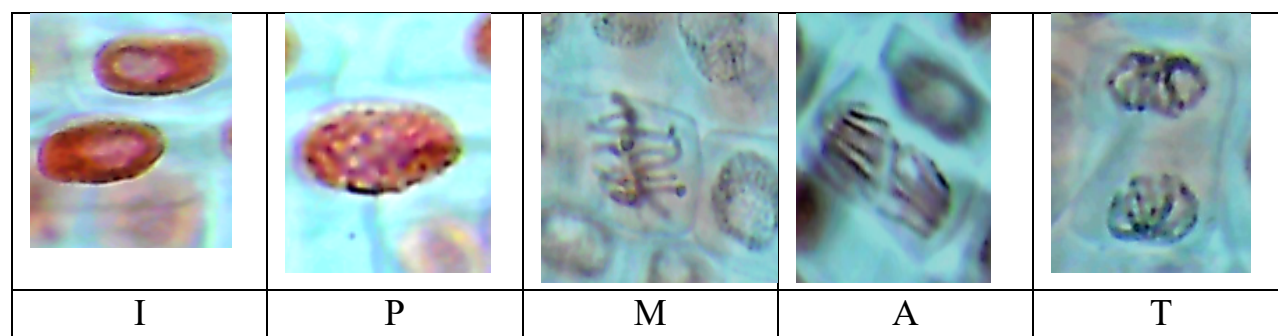


Рис. 2.2.1. представлені нормальні клітини на різних стадіях поділу: I – інтерфаза, P – профаза, M – метафаза, A – анафаза, T – телофаза.

Мітотичний індекс (MI, %) розраховували як співвідношення кількості клітин у стадії поділу до загальної кількості клітин (включно з клітинами в інтерфазі).

$$\text{Мітотичний індекс (MI)} = \frac{P + M + A + T}{\text{Загальна кількість оцінених клітин}} \times 100\%$$

Достовірність різниці MI між обробленими зразками та контролем визначали методом формальної статистики з використанням Т-критерію Стьюдента в середовищі Microsoft Excel. $P < 0,05$ вважали рівнем значущості.

Порушення поділу клітин і хромосомні аберації, такі як С-мітоз, липкість, злиплі хромосоми, деформована анафаза, хромосомні містки тощо, оцінювали за допомогою візуального аналізу предметних стекол із використанням збільшення $\times 1000$.

Мутагенність оцінювали за параметром індексу аберації (AI). Зверталась увага на виявлення клітин з порушеннями фаз мітозу та появою хромосомних аномалій (аберацій). AI був розрахований за наступною формулою.

$$\text{Індекс аберацій (AI)} = \frac{\text{кількість клітин з порушеннями та абераціями}}{\text{загальна кількість підрахованих клітин}} \times 100\%$$

Дослідження антимікробної активності

Здатність 12-ОФДК пригнічувати ріст мікроорганізмів досліджували методом диско-дифузії (Awerbuch, 1989). Як тестові штами для дослідження використовували три лабораторних штами диких типів із колекції Інституту мікробіології та вірусології імені Данила Заболотного НАН України:

- грам-негативні бактерії *Escherichia coli* UCM B-906,
- грам-позитивні спороутворюючі бактерії *Bacillus subtilis* UCM B-506 T,
- патогенні дріжджові гриби *Candida albicans* UCM D-6.

Перед проведенням тестування інокуляти культивували в м'ясо-пептонному бульйоні протягом 6 годин при температурі 37°C. Суспензії

інокулятів розводили до оптичної густини 0,5 за шкалою стандарту МакФарланда, що відповідає 10^8 колонієутворюючих одиниць (CFU) на мл.

Для дослідження антимікробних властивостей використовували 0,5 М розчин 12-ОФДК в етанолі. Стерильні фільтрувальні паперові диски занурювали в дослідний розчин, після чого етанол випаровували шляхом інкубації дисків протягом 15 хвилин за кімнатної температури в стерильних умовах. Дослідження проводили на твердому поживному агарі дисково-дифузійним методом.

Метод ґрунтується на проникненні хімічної сполуки в агар і пригніченні росту мікроорганізмів різного ступеню вираженості. Інокулят (одноденну культуру мікроорганізму на рідкому середовищі) щільно і рівномірно наносили тампоном на стерильний агар у чашках Петрі, після чого паперові диски, змочені у спиртовому розчині 12-ОФДК (витримані 15 хв для випаровування етанолу) розміщували на поверхні агару. Потім чашки Петрі інкубували за температури 37°C протягом 24 годин. Антимікробну активність оцінювали шляхом вимірювання розмірів зон інгібування навколо дисків.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1 Макроскопічний аналіз цитотоксичності

Макроскопічний аналіз коренів за довжиною та кількістю коренів показав чітку залежність від умов обробки: Cd пригнічував ріст коренів сильніше зі збільшенням його концентрації, тоді як 12-ОФДК, навпаки, стимулював ріст. Найрозвиненішу мичкувату кореневу систему (за довжиною та кількістю коренів) спостерігали в експерименті, де цибулини спочатку вирощували у воді, а потім у розчині 12-ОФДК з концентрацією 10 мкМ (Рис. 3.1).

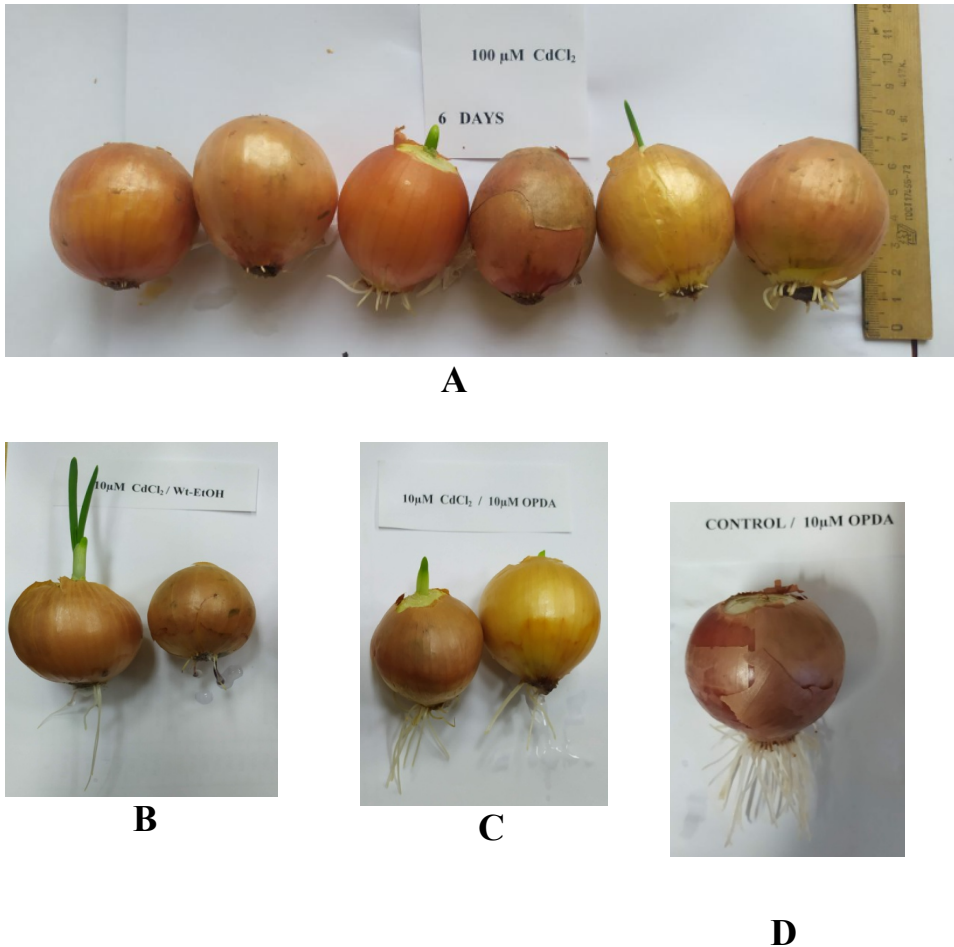


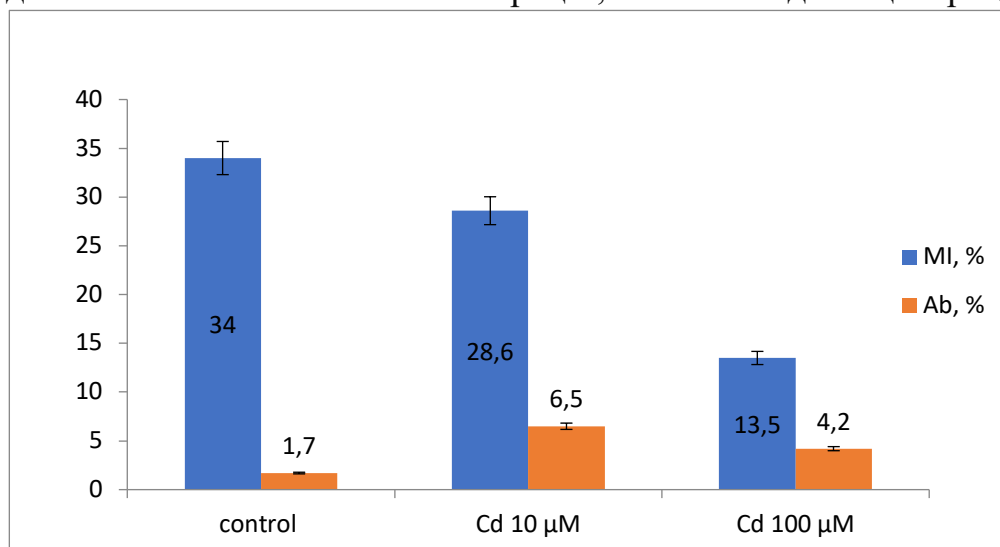
Рис 3.1.1. Активність росту коренів цибулин

- A) 6 днів у розчині 100 мкМ CdCl_2
- B) 6 днів у 10 μM CdCl_2 і 4 дні відновлення у воді з залишковою кількістю етанолу
- C) 6 днів у 10 μM CdCl_2 і наступні 4 дні обробки у 10 мкМ 12-ОФДК
- D) 6 днів у дистильованій воді та наступні 4 дні обробки у 10 μM 12-ОФДК

Мікроскопічний аналіз цитотоксичності: мітотичний індекс, індекс аберацій та типи аберацій

3.2 Шестиденне вирощування в розчині Cd

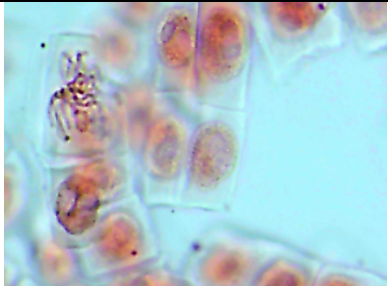
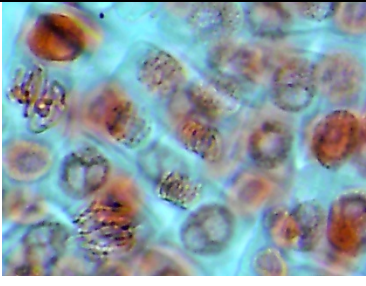
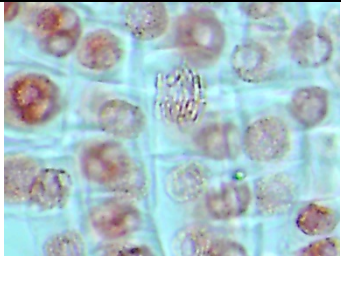
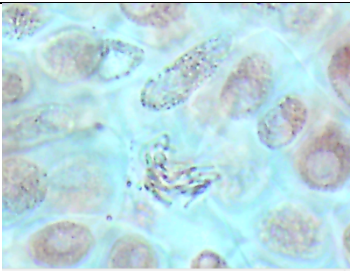
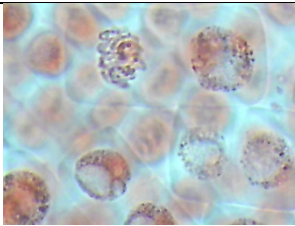
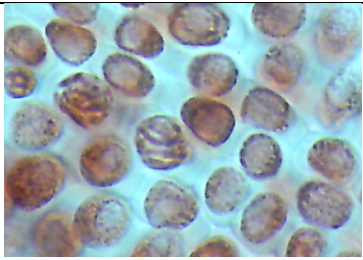
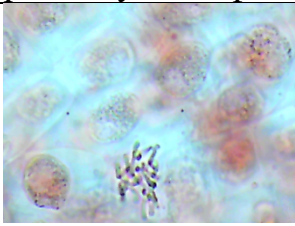
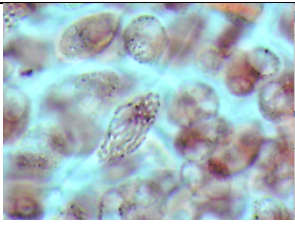
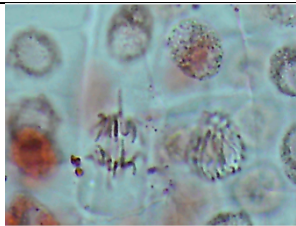
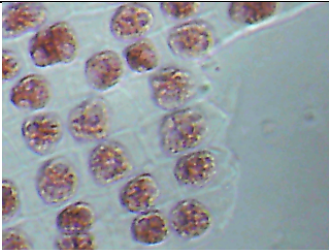
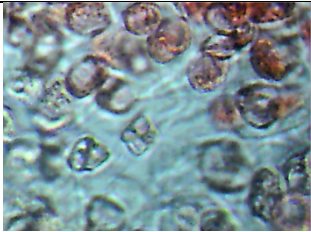
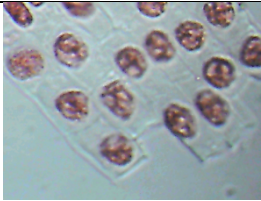
Мікроскопічний аналіз клітин меристеми коренів протягом шестиденного періоду вирощування в розчинах CdCl_2 виявив пригнічувальний вплив на клітинний поділ та збільшення кількості аберацій, залежно від концентрації Cd



(Рис. 3.2.1.).

Рис. 3.2.1. Генотоксичність гострого впливу Cd на корені цибулі. Значення МІ та ІА коренів цибулі після 6 днів впливу CdCl_2 .

Класифікація аберацій, виявлених під час мікроскопічного аналізу коренів, які зазнали впливу CdCl_2 (Рис. 3.2.1).

Control		
		
С-метафаза, хромосоми, що злиплися	Стиснута анафаза	Анафазний місток
10 мкМ Cd		
		
Стиснута деформована анафаза -2 поляризація розлому в анафазі	Профаза пікнозу	Профаза пікнозу -2
		
С-метафаза	Хромосомні містки в анафазі	Відстала хромосома
100 мкМ Cd		
		
Профаза пікнозу	Профаза пікнозу	Подовжені дрібні клітини. Профаза пікнозу

Таблиця. 3.2.1. Порушення поділу клітин і хромосомні аномалії в експерименті з 6 днями вирощування в розчинах Cd.

3.3 Ефекти обробки рослин розчином 12-ОФДК

Цибулини цибулі були вилучені з розчинів Cd або контрольного водного розчину і негайно поміщені в розчин 12-ОФДК. Мікроскопічний аналіз зрізів був проведений після 4 (Рис. 3.4, 3.5) та 12 днів обробки (Рис. 3.6, 3.7).

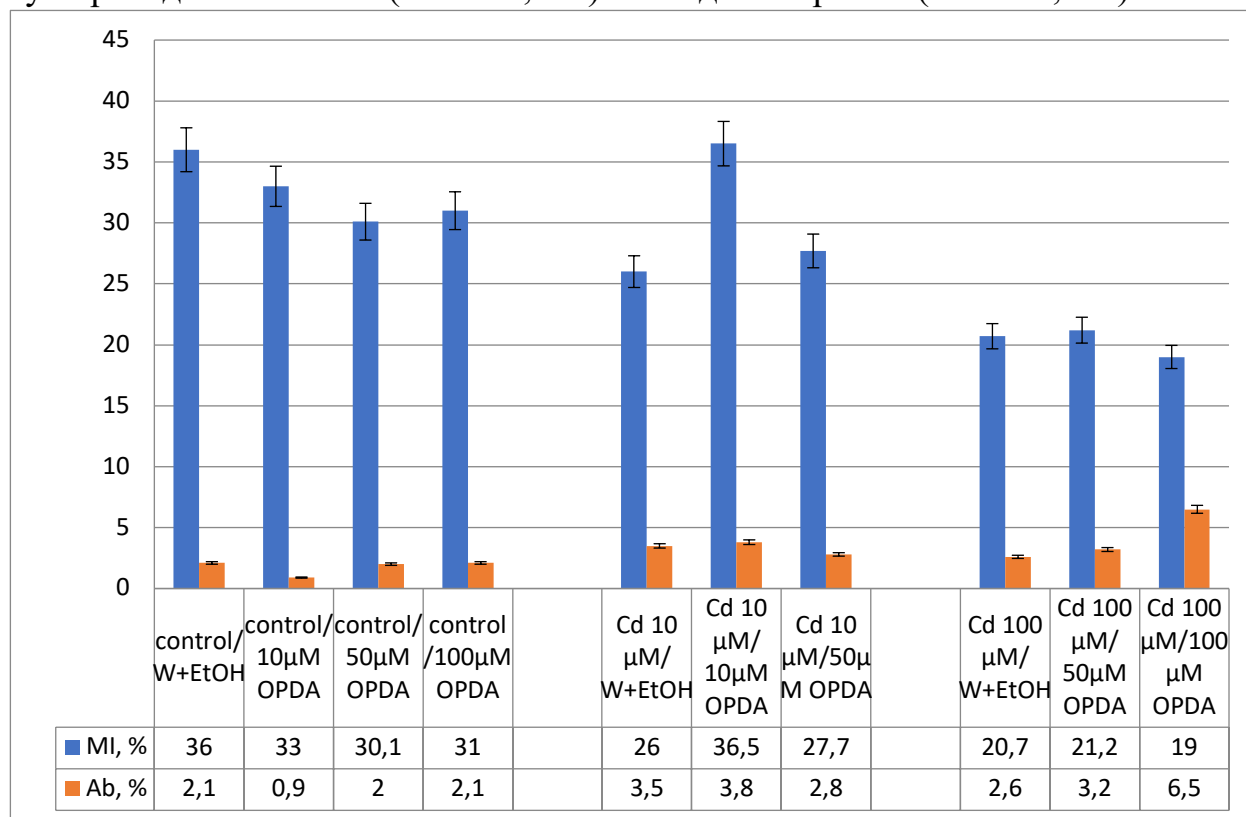
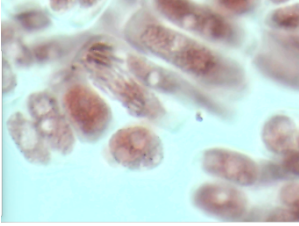
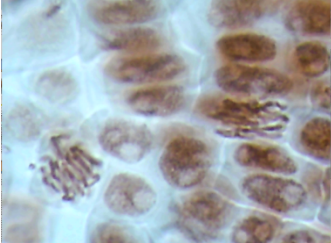
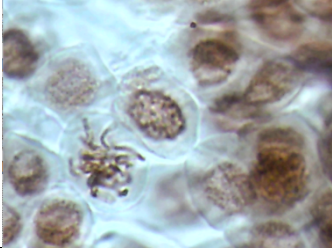
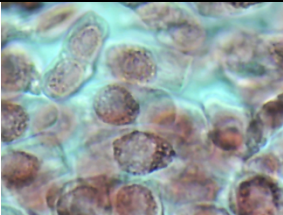
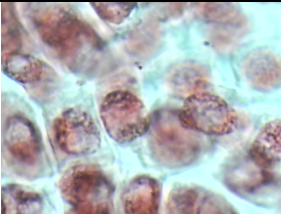
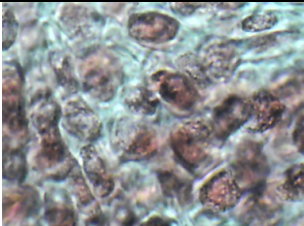
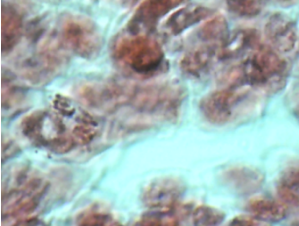
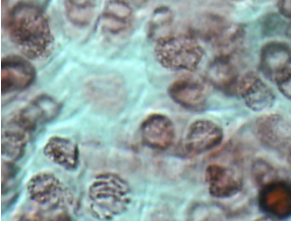
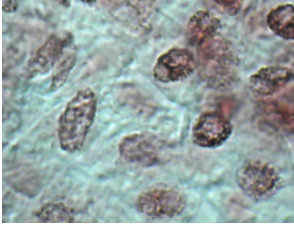
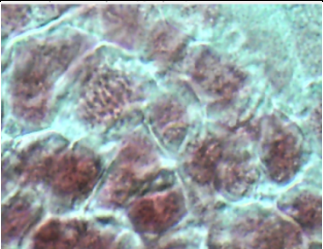
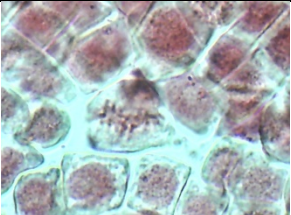
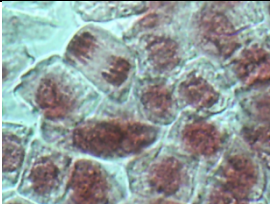
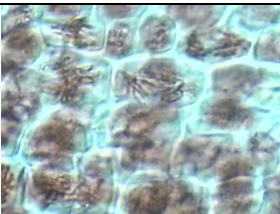
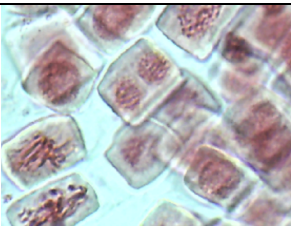
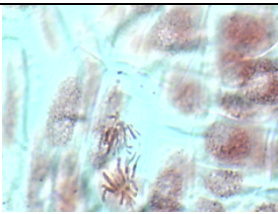
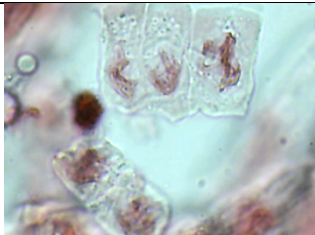
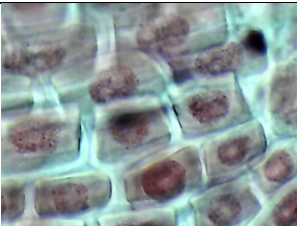
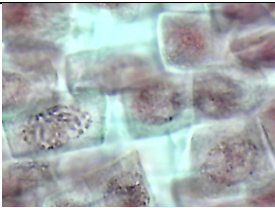
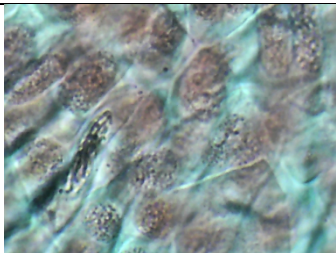
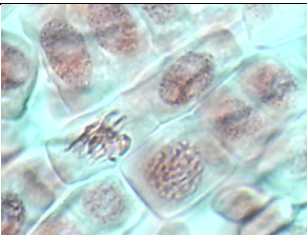
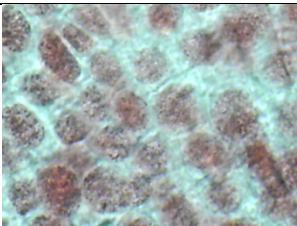
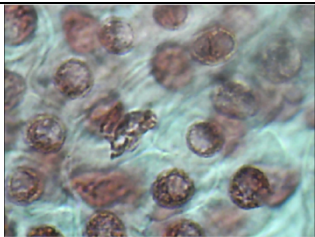
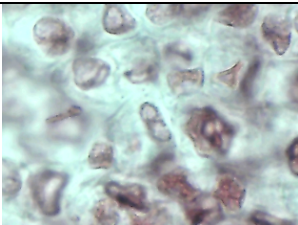
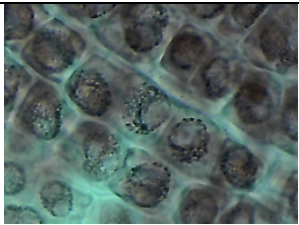
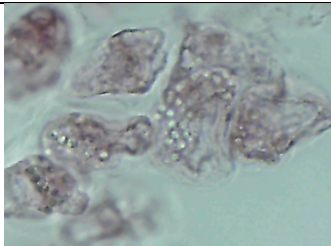
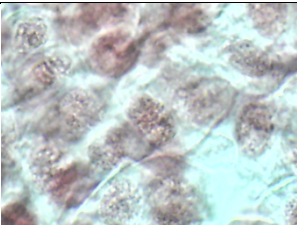
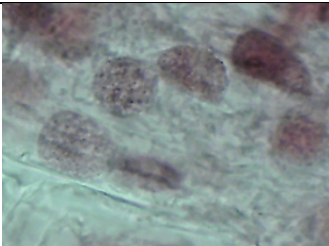


Рис. 3.3.1. Генотоксичні ефекти Cd на меристему кореня цибулі з /без обробки 12-ОФДК протягом 4 днів. Значення МІ та АІ на 4-й день обробки 12-ОФДК після 6 днів впливу Cd або контрольних умов, як зазначено.

Control / W-EtOH		
		
Стиснута анафаза	Стиснута анафаза	С- метафаза, блукаюча хромосома
Control / 12-OPDA 50 мкМ		
		
Профази пікнозу	Профази пікнозу	Профази пікнозу
Control / 12-OPDA 100 мкМ		
		
С-анафаза	Профаза з пікнозом	Профази пікнозу
Cd 10 мкМ / W+EtOH		
		
Профаза пікнозу	С-метафаза	Порушена анафаза
Cd 10 мкМ / 12-OPDA 10 мкМ		
		

Стиснута анафаза С-метафаза	Стиснута зруйнована анафаза, містки	Відстаючі хромосоми
Cd 10 мкМ / 12-OPDA 50 мкМ		
		
Пікноз	Клітини під легким осмотичним шоком	Пікноз у профазі
Cd 100 мкМ / W-EtOH		
		
Стиснута анафаза з хромосомними містки	С-анафаза	Осмотичний шок
Cd 100 мкМ / 12-OPDA 50 мкМ		
		
Пікноз	Осмотичний шок	Осмотичний шок
Cd 100 мкМ / 12-OPDA 100 мкМ		
		
Осмотичний шок, гранульована цитоплазма. Усі клітини пошкоджені, а мембрана зруйнована		

Таблиця. 3.3.1. Порушення поділу клітин і хромосомні аномалії в експерименті 4-денного лікування 12-ОФДК. Загальний час росту кореня – 10 днів.

Ріст кореня цибулі в розчині 12-ОФДК або воді тривав, і зразки меристеми були взяті для мікроскопічного аналізу на 12-й день обробки. Варто зазначити, що стан клітин меристеми дещо змінився. Зокрема, ті клітини, які культивувалися перші 6 днів у розчині 100 мкМ хлориду Cd, а потім були переведені у дистильовану воду (контроль), повністю загинули. Результати розрахунків МІ та АІ представлені на рис. 3.6, а зображення клітин без порушень фаз поділу, а також з аномаліями та ознаками виявлення токсичності клітин показано на рис.3.4.2.

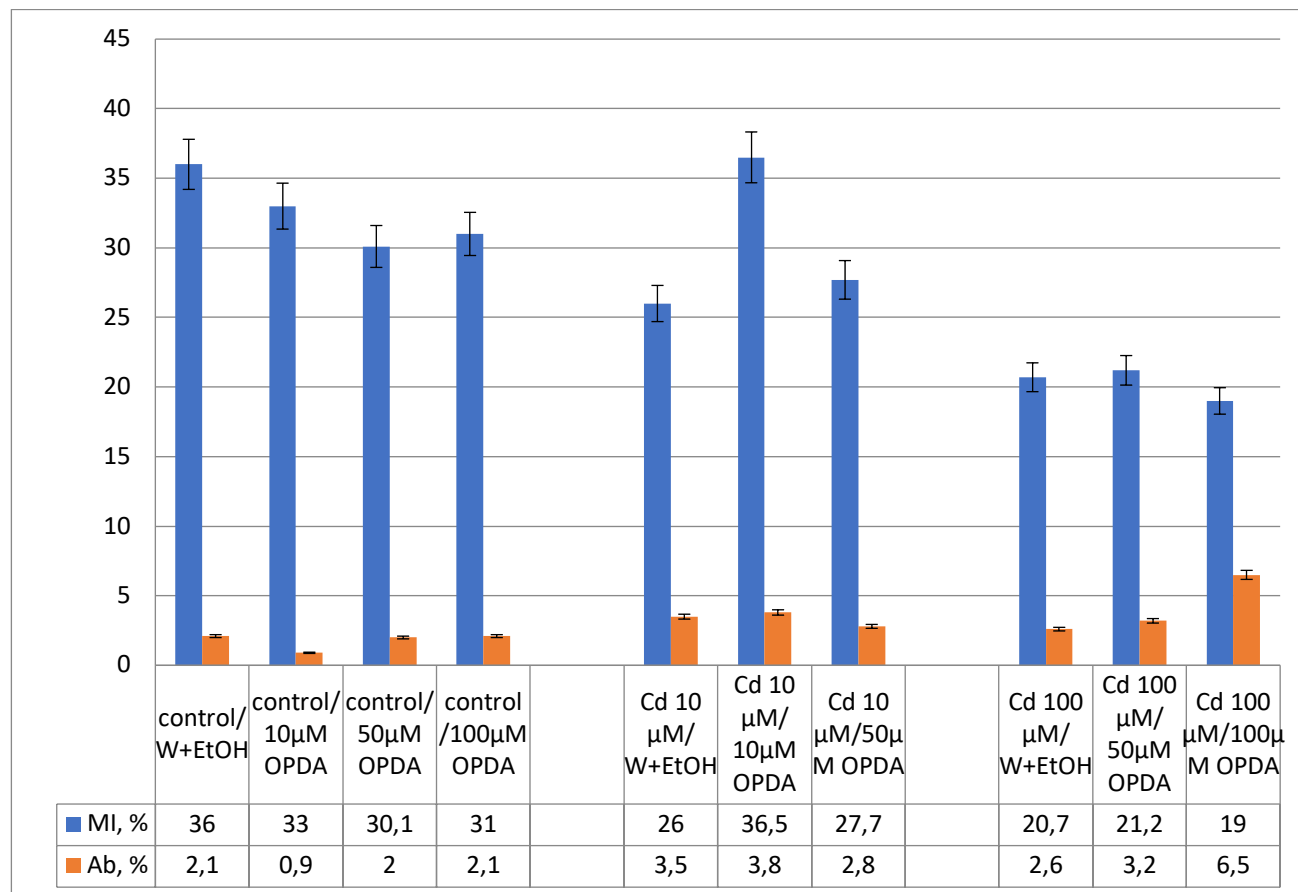
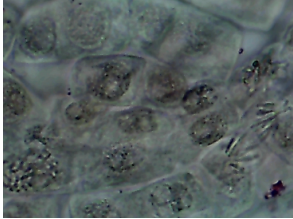
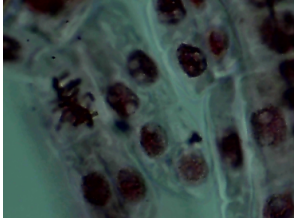
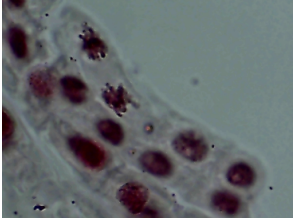
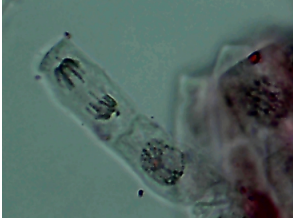
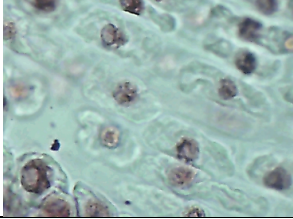
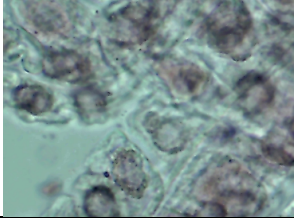
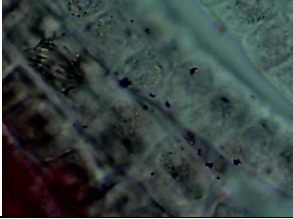
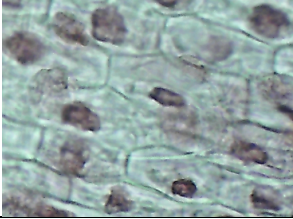
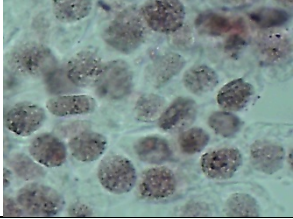
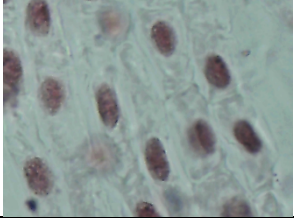
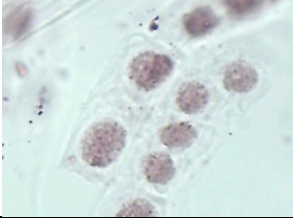
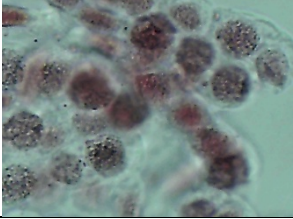
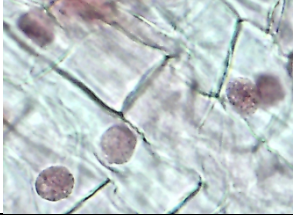
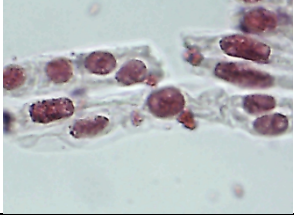
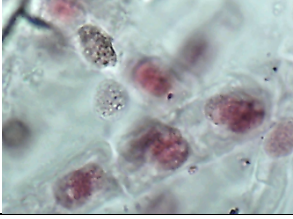
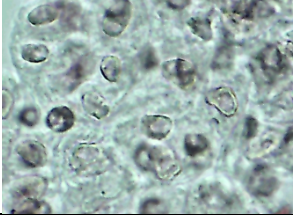
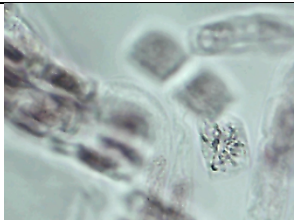
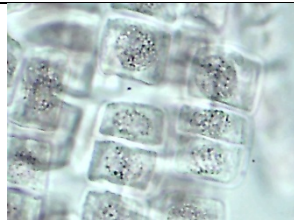
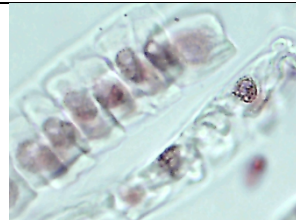
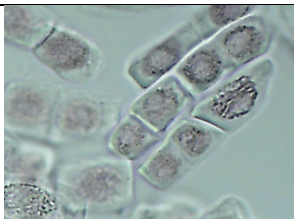
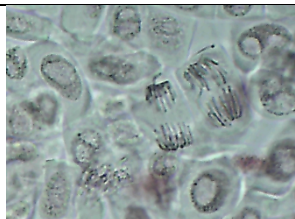
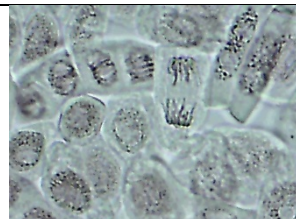
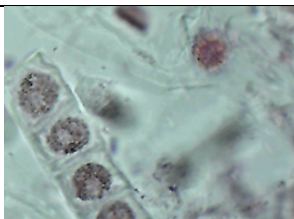
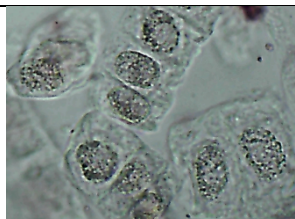
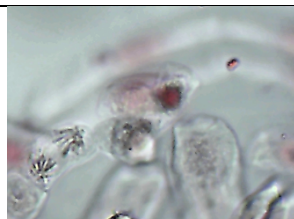
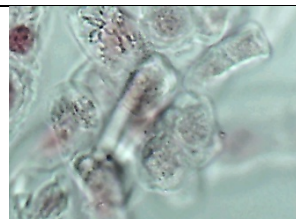
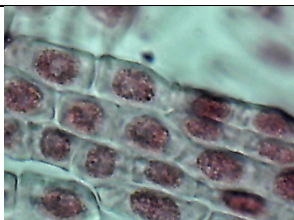
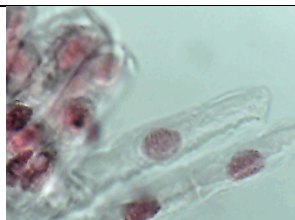
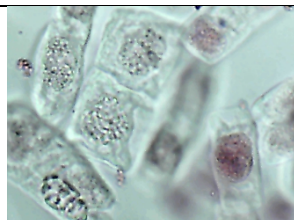
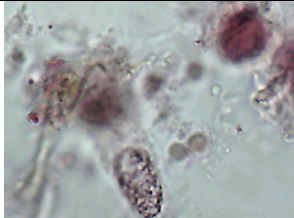
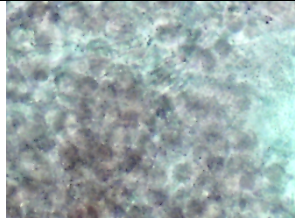
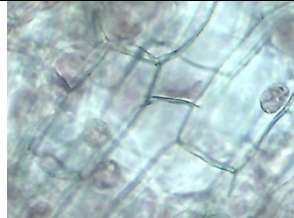
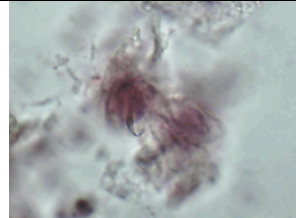
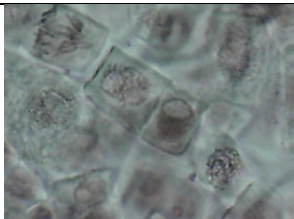
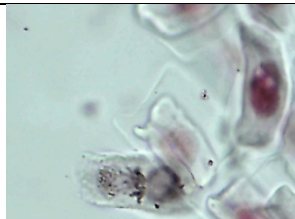
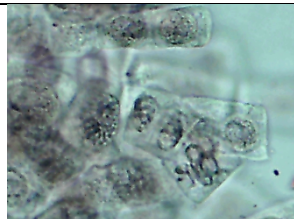
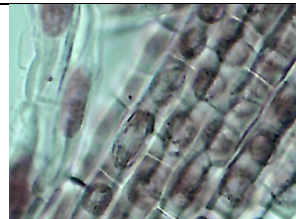
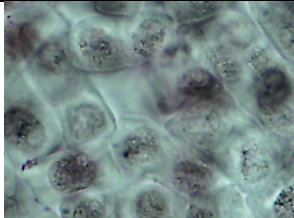
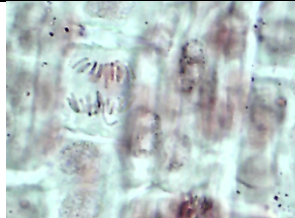
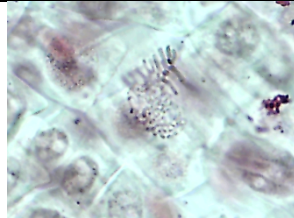
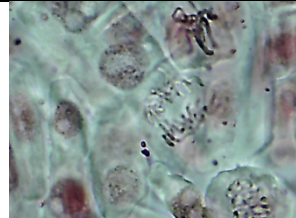


Рис. 3.4.2. Генотоксичні ефекти Cd на меристему кореня цибулі з або без обробки 12-ОФДК протягом 12 днів. Результати МІ та АІ на 12-й день обробки 12-ОФДК після 6 днів експозиції до CdCl₂ (10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ) або води як контрольного зразка

Контроль дистильованої води протягом усіх 18 днів			
			
Нормальні клітини в I, II, А	Нормальні клітини в I, М	Нормальні клітини в I, II, Т	Нормальні клітини в А, II
Control / W-EtOH			
			
Легкий осмотичний шок	Легкий осмотичний шок	Відстала хромосома	Нормальні клітини в I, II
Control / 12-OPDA 10 мкМ			
			
Нормальні клітини в I, II	Легкий осмотичний шок	Нормальні клітини в II	Нормальні клітини в I, II
Control / 12-OPDA 50 мкМ			
			
Подовжені клітини та особливості осмотичного стресу. М, А, Т не спостерігається			

Control / 12-OPDA 100 мкМ			
			
Нерегулярна метафаза	Осмотичний стрес	Клітини в П	Клітини в І, П зазнають осмотичного стресу
Cd 10 мкМ / W-EtOH			
			
Пікноз у профазі	Відсталі хромосоми в А	Порушена метафаза	С-анафази
Cd 10 мкМ / 12-OPDA 10 мкМ			
			
Нормальний І і П	Нормальний П	С-анафаза	Порушений М
Cd 10 мкМ / 12-OPDA 50 мкМ			
			
Подовжені клітини в умовах осмотичного стресу	Профаза пікнозу	Нормальні клітини в І, П	

Cd 100 мкМ / W-EtOH			
			
Більшість клітин було зруйновано			
Cd 100 мкМ / 12-OPDA 50 мкМ			
			
Анафаза з мостом	Порушена анафаза	Порушена метафаза	Анафаза з мостом
Cd 100 мкМ / 12-OPDA 100 мкМ			
			
Клітини в I, II	Відстала хромосома в А	Клітини в I, II, III	Порушений III і А

Таблиця. 3.4.2. Стан меристематичних клітин з нормальними структурами, порушеннями мітотичного поділу та хромосомними аномаліями в зразках, отриманих після 12 днів обробки 12-ОФДК. Загальний час росту кореня становив 18 днів.

3.4 Антимікробна активність 12-ОФДК проти модельних штамів бактерій і дріжів

Escherichia coli — це грамнегативна бактерія, яка зазвичай зустрічається в нижньому відділі кишечника теплокровних організмів, включаючи людину. Хоча більшість штамів *E. coli* нешкідливі, деякі можуть викликати важкі харчові отруєння, інфекції сечовивідних шляхів та інші захворювання, особливо якщо містять гени, що сприяють утворенню токсинів. *E. coli* широко використовується

в дослідженнях і біотехнології завдяки швидкому росту і добре вивченій генетиці, відіграючи ключову роль у багатьох наукових досягненнях і виступаючи моделлю в молекулярно-біологічних дослідженнях.

Bacillus subtilis, також відомий як сінна паличка, — це грампозитивна, паличкоподібна, каталаза-позитивна бактерія, яка зустрічається в ґрунті та шлунково-кишковому тракті жуйних тварин. Вона здатна утворювати захисні ендоспори, що дозволяє їй виживати в екстремальних умовах навколишнього середовища. *B. subtilis* визнаний моделлю для вивчення реплікації бактеріальної хромосоми та диференціації клітин. Ця бактерія цінується за здатність виробляти секреторні ферменти і широко використовується біотехнологічними компаніями в промислових масштабах.

Candida albicans — це умовно-патогенний дріжджовий гриб, що зазвичай входить до складу мікрофлори кишечника людини та здатний виживати поза організмом. Він діє як опортуністичний патоген, викликаючи інфекції у разі ослаблення імунної системи господаря або дисбалансу в мікробіомі організму.

Дисково-дифузійний тест на агарі виявив різний вплив 12-ОФДК на три мікроорганізми. Особливий інтерес викликала стійкість *E. coli*. Це може бути цікавим у випадку використання генетично модифікованих клітин *E. coli* для синтезу 12-ОФДК як каталізатора в цілісній клітині (Рис. 3.8a). Висока інгібуюча активність щодо *B. subtilis* була очевидна завдяки великим зонам інгібування розміром 8-9 мм. Найсильніший інгібіторний вплив 12-ОФДК був виявлений на *C. albicans*, оскільки спостерігалися чіткі, повністю прозорі зони інгібування розміром 9-10 мм у межах дифузії 12-ОФДК в агарове середовище (Рис. 3.8b, c).. (Fig.3.8b,c).

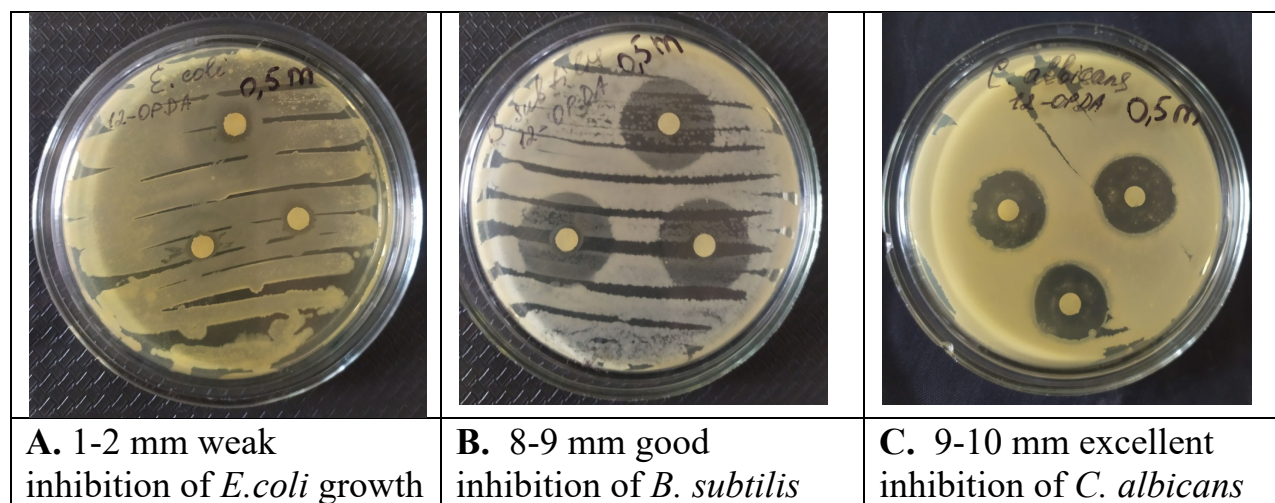


Рис. 3.5.1. Зони пригнічення росту мікробної культури, доступні методом дискової дифузії на агарі після 24 годин інкубації.

Кадмій індукує генотоксичний стрес у клітинах, починаючи з найнижчої досліджуваної концентрації 10 мкМ. Ми зареєстрували достовірне зниження мітотичного індексу на 20% порівняно з контролем. Кадмій у концентрації 10 мкМ не тільки пригнічує поділ, але й призводить до загибелі клітин, навіть за відсутності тривалої експозиції (достатньою мірою продемонстровано після 6 днів культивування з наступною заміною на дистильовану воду).

12-OPDA здатний регенерувати меристематичну тканину після впливу як помірних, так і високих доз Cd. Показники регенерації були кращими після 12 днів обробки порівняно з 4 днями обробки. Найсуттєвіший вплив на ріст і поділ клітин спостерігався при застосуванні 12-ОПДА в концентрації 10 мкМ. Вплив високих концентрацій 100 мкМ OPDA на клітини через 4 доби викликав ознаки осмотичного шоку та збільшував відсоток аберацій мітотичної фази. Ймовірно, що під час подальшого росту в розчині рослина адаптувалася до дії фітогормону.

Вивчення антимікробної дії розчину 12-ОПДА показало, що цей препарат є високоефективним проти патогенних дріжджів *C. albicans*. Для визначення мінімальної фунгіцидної концентрації необхідні подальші дослідження з використанням методу серійних розведень.

СТРАТЕГІЯ МАРКЕТИНГУ ДЛЯ ВИВЕДЕННЯ НА РИНОК

4.1. Загальна характеристика розробки

Ідея розробки: Створення ефективного підходу для отримання 12-оксофїтодієнної кислоти (12-ОФДК) біокаталітичним методом та визначенні її властивостей.

Ринкова ідея: Дослідити потенціал 12-ОФДК як багатофункціональної сполуки.

Позиціонування ідеї на ринку: Партизан.

Мета науково-технічної розробки: біокаталітичний синтез 12-ОФДК та визначення її антимікробних та цитотоксичних властивостей, а також здатності відновлювати рослини від стресу, спричиненого важкими металами.

Тема дослідження: Біокаталітичний синтез 12-оксофїтодієнної кислоти та її біологічні властивості.

Назва розробки: Біокаталітичний синтез 12-оксофїтодієнної кислоти та її біологічні властивості.

Суб'єкт: Дарменко Марія Володимирівна, студентка 6 курсу КПІ ім. Ігоря Сікорського

Об'єкт дослідження: 12-оксофїтодієнова кислота.

Місце розробки у інноваційному ланцюжку цінності: Розробка

Основні ціннісні пропозиції за напрямом ринкової ідеї: Ця розробка має потенціал для застосування в екології, сільському господарстві та медицині. Зокрема, 12-ОФДК може бути використана як засіб для підвищення стійкості рослин до стресових факторів, у боротьбі з патогенами або як модельна сполука для вивчення природних механізмів регуляції клітинних процесів.

Прогнозний обсяг випуску продукту за місяцями (на перший рік): За перший рік – 1 рецептура.

Споживач: Науково-дослідницькі інститути .

Ринок збуту: Україна, Європа

4.2. Аналіз прогностичних ринкових позицій розробки

4.2.1. Аналіз зовнішнього та зовнішньо-оперативного середовищ

Аналіз зовнішнього та зовнішньо оперативного середовища розробки подано у наступних двох таблицях:

Розробка рецептури хімічно-активної речовини						
Фактор	Загрози/Недоліки			Можливості/Переваги		
	Сутність	Ймовірність настання %	Вплив на цінність, %	Сутність	Ймовірність настання, %	Вплив на цінність, %
Фактори зовнішнього середовища						
Політика						
Вступ країни до міжнародних організацій, союзів, об'єднань	Перехід підприємства на міжнародні стандарт	100	70	Розширення ринку збуту	30%	80
Взаємовідносини території із сусідніми державами	Проблема з логістикою	100	85	Спрощення процесів експорту	60	50
Близькість кордонів сусідніх держав	Зменшиться велика кількість потенційних споживачів.	100	85	Спрощення покращення транспортування	60	50
Кризисна ситуація в країні	Збільшення вартості сировини Проблеми з доставкою сировини Проблеми з доставкою продукту закордон	50	75	Можливий вихід конкурентів з ринку.	5	20
Періодичність виборів на території	Прихід до влади людини, яка не захоче підтримувати підприємницьку діяльність в хімічній галузі	20	100	Прихід до влади людини, яка захоче підтримувати підприємницьку діяльність в хімічній галузі	20	50
Економіка						
Зміна швидкості росту інфляції	Збільшення вартості сировини Зниження попиту на продукт	80	100	Отримання додаткових коштів за рахунок різниці у курсах валют	35	80
Перспективи на ринку виду економічної діяльності	Низькі перспективи на ринку	50	80	Високі перспективи на ринку	60	100
Зниження платоспроможності населення	Зниження попиту на продукт	10	70	Зниження цін на сировину	15	80
Середня рентабельність виду економічної діяльності	Низька середня рентабельність	60	70	Висока середня рентабельність	55	100

Доступність до ринку сировини, обладнання та комплектуючих	-Дефіцит ресурсів	60	100	Високі перспективи на ринку	60	100
Культура						
Готовність населення до саморозвитку	Населення не готове до саморозвитку	15	10	Готовність населення до саморозвитку	85	50
Зміна рівня освіти	Уповільнення рішення деяких проблем за рахунок менш освідених працівників Зниження трудової дисципліни через неосвіченість людей	15	70	Покращення якості виконаної роботи через підвищення рівня освіти в колективі	10	60
Ставлення до корупції і інших протиправних дій суб'єктів господарювання	Суб'єкти господарювання недбало та пофігістично ставляться до корупції і інших протиправних дій суб'єктів господарювання	10	10	Суб'єкти господарювання намагаються протидіяти до корупції і інших протиправних дій суб'єктів господарювання	30	15
Культура споживання території	Культура споживання території на жаливому рівні	10	20	Культура споживання території на високому рівні	60	20
Географія						
Особливості території з питань доступу до ринків сировини	Несприятливе розташування території для доступу до ринків сировини	10	100	Чудове розташування території для доступу до ринків сировини		80
Доступність чи недоступність закордонних ринків	Недоступність закордонних ринків	10	60	Доступність закордонних ринків	80	95
Особливості території для логістичного розвитку	Несприятливе розташування території для логістичного розвитку	20	100	Чудове розташування території для логістичного розвитку		80
Вступ території до міжнародних економічних союзів, об'єднань	Вступ до міжнародних організацій спочатку може стати перешкодою для підприємства, оскільки у них своїх виробництв багато	50	70	Вступ до міжнародних організацій стане чудовою нагодою для розширення збуту, а також продукцію легше буде транспортувати	40	80
Рівень оподаткування території	Високий рівень оподаткування території	30	80	Низький рівень оподаткування території	30	80
Демографія						
Рівень смертності	Зниження кількості кваліфікованих спеціалістів в Україні	10	90	Чим більше люди хворіють онкологічними захворювання тим більше потреба в ліках	20	70
Рівень захворюваності	Зниження кількості кваліфікованих спеціалістів в Україні	10	90		20	70
Міграція	Зниження кількості кваліфікованих спеціалістів в Україні	10	90	Збільшення кількості потенційних клієнтів серед українських мігрантів закордоном	15	60
НТП						
Готовність впроваджувати інновації	Неготовність впроваджувати інновації	10	20	Готовність впроваджувати інновації	50	80
Швидке дослідження	Поява більш досконалих методик синтезу продукту, що	15	80	Можливість покращення методики виготовлення продукту	15	70

теми комерціалізації	будуть використовуватися конкурентами					
Готовність самостійно генерувати інноваційні зміни	Неготовність самостійно генерувати інноваційні зміни	10	5	Готовність самостійно генерувати інноваційні зміни	70	80
Технічний розвиток	Застарівання обладнання та технологій, що використовуються підприємством Зниження кількості кваліфікованих спеціалістів	15	50	Поява нового більш досконалого обладнання	10	85
Вміння гарантувати захист інновацій	Невміння гарантувати захист інновацій	10	30	Вміння гарантувати захист інновацій	60	90
Фактори зовнішнього оперативного середовища						

Постачальники						
Пунктуальність	Не зможуть доставляти одразу, не виконують замовлення у зазначений термін, запізнюються	30	80	Доставка здійснюється одразу після замовлення, приходить у зазначений термін, не запізнюються	70	90
Відповідальність	Не мають жодних документів та сертифікатів на сировину	20	50	Мають та складають усю необхідну документацію	80	50
Обсяги	Не зможуть надавати необхідний обсяг сировини	30	80	Зможуть надавати необхідний обсяг сировини	80	90
Запаси і резерви	Нестача запасів та резервів можуть призвести до затримок у виробництві, що буде мати вплив на трудовий колектив та виробництво продукції	15	60	Запаси сировини дозволять працювати виробництву у разі проблем із постачальниками	80	60
Транспортне і логістичне забезпечення	Не наявність власного кур'єру або взагалі неможливість доставки	10	70	Наявність власного кур'єру чи оперативна доставка поштою	60	80
Споживачі						
Розвиток споживача (волатильність, періодичність кардинальних змін бажань)	Невідповідність бажаного та реального обсягу споживання	30	70	Просувати та вдосконалювати продукт за допомогою потреб споживачів	50	40
Терміни	Термін придатності закінчується дуже швидко	5	35	Термін придатності є достатньо великим	80	60
Доставка	Територія доставки маленька, доставка повільна	15	90	Доставка швидка, доставляє в усі куточки світу, товар можна доставляти	99	100
Екологічні вимоги	Товар не відповідає екологічним вимогам	10	99	Товар відповідає екологічним вимогам	99	70
Фактори внутрішнього середовища						
Організація управління та персонал	Вірогідність високої плинності кадрів Недостатня кількість кваліфікованих працівників	35	60	Рациональна організаційна структури підприємства Безкоштовна підготовка працівників	70	80

Фінанси	Недостатня кількість оборотних засобів Нестабільний фінансовий стан Знецінення накопичених коштів за рахунок інфляції	50	100	Достатні фінансові ресурси	60	90
Виробництво	Велика енергоємність обладнання	80	90	Висока конкурентоспроможність продукції Використання сировини високої якості Контроль якості усієї продукції	90	80

4.2.2. Потенційні конкуренти, споживачі, постачальники та посередники.

Квадрат Бове

Розглянемо перелік можливих конкурентів в різних напрямках конкуренції та сформуємо квадрат Бове.

Перелік основних потенційних конкурентів наукової розробки на ринку		
Напрямок конкуренції	Назва конкурента	Контакти конкурента
За географічним розташуванням розробника (Київ)	«Enamin»	вулиця Вінстона Черчилля, 67, м.Київ
	«Укроргсинтез»	вул. Черчилля Вінстона, 85 м. Київ,
За географією ринку збуту (Україна)	«Enamin»	вулиця Вінстона Черчилля, 67, м.Київ
	«Укроргсинтез»	вул. Черчилля Вінстона, 85 м. Київ,
	Fakultät für Chemie	Німечинна
	Universität Bielefeld	Німечинна
За технологією розробки	Fakultät für Chemie	Німечинна
	Universität Bielefeld	Німечинна
За ідеєю розробки	Fakultät für Chemie	Німечинна
	Universität Bielefeld	Німечинна

Таблиця 4.2.2 – Перелік потенційних конкурентів

Здійснено аналіз потенційного ринку збуту і конкурентного середовища на ньому за методом квадрату Бове (рис. 5.2.1). Моє підприємство з технологією виготовлення твердого шампуню буде відноситись до загону партизанів.

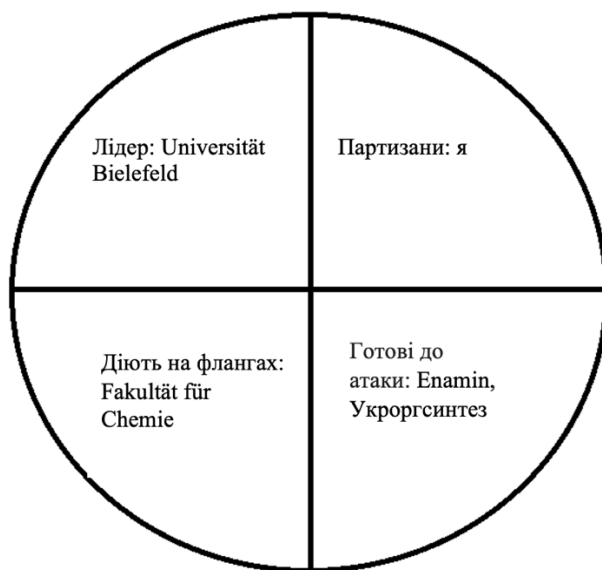


Рисунок 4.2.1 – Квадрат Бове

Таблиця 4.2.3 – Аналіз споживача (виробництва)

Критерій оцінки потенційного споживача	Значення
Форма власності	Приватне
КВЕД	Клас 20.59 Виробництво іншої хімічної продукції
За потужністю	Мале
За рівнем спеціалізації	Вузькопрофільне
За ресурсами, що споживаються	Матеріаломістке
За чисельністю персоналу	Мале
За сферою діяльності	Виробниче
За приналежністю капіталу і контролю	Національне
За географічним розташуванням	Україна

4.2.3. Метод Шонфільда для реалізації розробки

Методом Шонфільда визначаємо ключові фактори успіху проекту. Дані за даним методом представлені в таблиці 5.4.

Таблиця 4.2.4 – Оцінка характеристики за методом Шонфільда

Критерій	Моя розробка	Речовина випущена Enamin	Речовина випущена Universität Bielefeld	Речовина випущена Fakultät für Chemie
Ціна товару, грн	1,4	1,6	1,	1,4
Чистота товару, %	2,7	2,4	3	2,5
Час виконання, тижнів	1,5	1,75	2	2

На підставі отриманих бальних значень будемо графік (рис. 5.2.2) – порівняння конкурентних переваг нашої рецептури косметичного засобу з конкурентами.

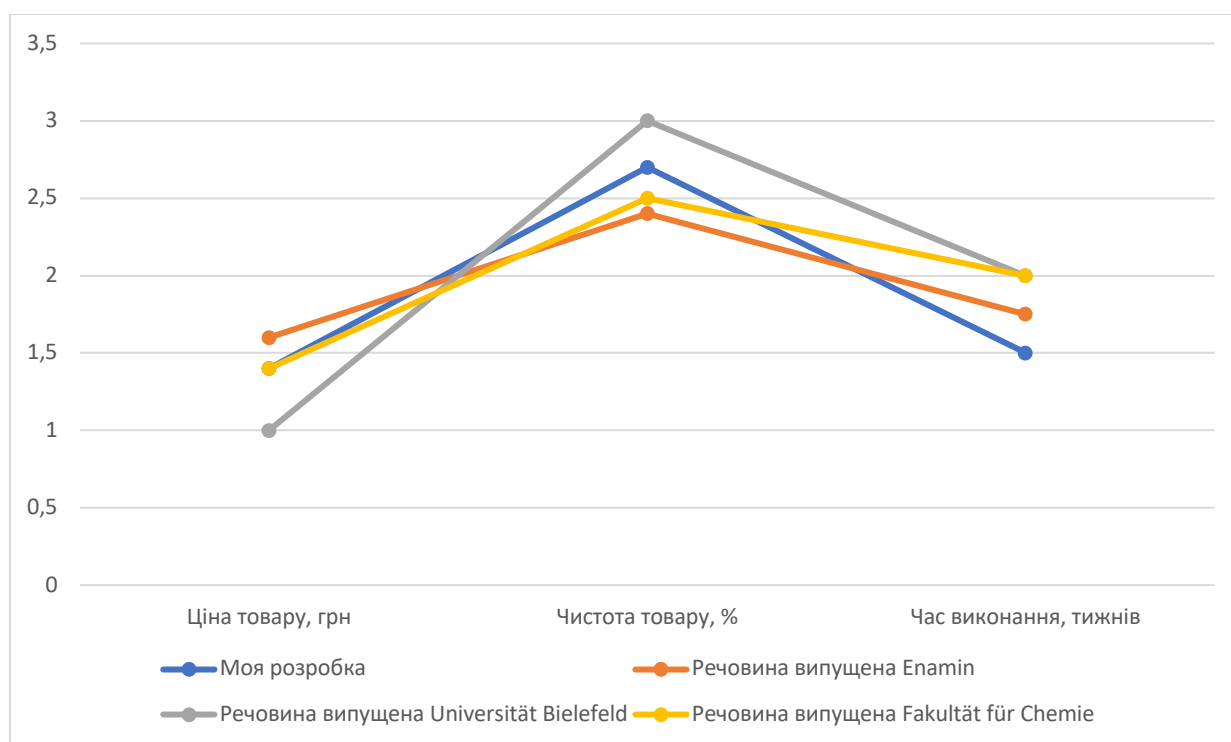


Рисунок 4.2.2 – Порівняння конкурентних переваг підприємства з іншими

За даними діаграми видно, що ключовим факторам успіху для мого продукту є чистота кінцевого продукту та час виконання роботи. З цього можна зробити висновок що моя речовина є досить конкурентоздатною

4.3. Фінансові складові розробки

Розраховуємо ціну та максимально допустиму собівартість за різними методами для технології виробництва.

Витратний метод:

Виготовляється 1 технологія за рік; на одну технологію є рік, робота виконується 3 рази в тиждень по 4 години, разом, нехай - 576 год/рік
ЗП – 250 000 грн/рік (ЗП наукового керівника + розробника (студент))

А – 100 000 грн

Витрати на необхідні ресурси (електроенергія, частини обладн. та інш.) - 400 000 грн/рік

Сумуємо показники:

$$\text{ЗП} + \text{А} + \text{Витр. на ресурси} = 250\,000 + 100\,000 + 400\,000 = 750\,000 \text{ грн}$$

$$\text{Ціна} = 750\,000 \text{ грн (max.собівартість)}$$

$$\text{Прогнозована ціна} = 750\,000 \text{ грн} * 1,03 = 772\,500 \text{ грн}$$

$$\text{Плановий прибуток} = 772\,500 - 750\,000 = 22\,500 \text{ грн}$$

Агрегатний метод:

Продукт складається з 4 категорій (виконання дослідження, найнятий робітник, обладнання, реактиви): 15 000 грн, 8 000 грн, 150 000 грн, 10 000 грн

Норми витрат: 14 од/рік., 14 од/рік., 2 од/рік., 14 од/рік.

$$\begin{aligned} \text{Ціна} &= 14 * 15\,000 + 14 * 8\,000 + 2 * 150\,000 + 14 * 10\,000 = \\ &= 762\,000 \text{ грн (max.собівартість)} \end{aligned}$$

$$\text{Прогнозована ціна: } 762\,000 * 1,03 = 784\,860 \text{ грн}$$

$$\text{Плановий прибуток} = 784\,860 - 762\,000 = 22\,860 \text{ грн}$$

Параметричний метод:

Таблиця 4.3.1- Розрахунок параметричним методом

Показник	Вагомість	Оцінка характеристики розробки для конкурентів	

	показники на ринку	Коеф. Збільшення/зменшення	Моя розробка	Речовина випущена Епамін	Речовина випущена Фармак	Речовина випущена Biyu Biotechnology
Ціна, грн	25%	30%	5	4	3	2
Якісний склад, постачальник	20%	20%	5	4	3	5
Економія часу, год/рік	15%	30%	5	4	3	4
Ефективність, шт./грн	25%	-5%	4	5	4	5
Економія витрат, грн/рік	25%	20%	3	4	4	4

Середня ціна на технологію: 700 000 грн

$$25 \cdot 30 + 20 \cdot 20 + 15 \cdot 30 - 25 \cdot 5 + 20 \cdot 20 = 7,5\% + 4\% + 4,5\% - 0,125\% + 5\%$$

Прогнозована ціна: $700\,000 \cdot (1 + 0,075 + 0,04 + 0,045 - 0,0175 + 0,05) = 650\,000$

$$\cdot 1,19 = 775\,125 \text{ грн}$$

Конкурентний метод:

Конкурентний метод - полягає у встановленні ціни на продукт через аналіз і порівняння цін на аналогічний товар у конкурентів. Тобто, ціна на речовину має відповідати існуючому рівню цін на ринку аналогічних товарів.

На підставі точки беззбитковості:

Виготовляється 1 технологія за рік; на одну технологію є рік, робота виконується 3 рази в тиждень по 4 години, разом, нехай - 576 год/рік

ЗП – 250 000 грн/рік (ЗП наукового керівника + розробника (студент))

А – 100 000 грн

Витрати на необхідні ресурси (реагенти, електроенергія, частини обладн. та інш.) - 400 000 грн/рік

Сумуємо показники:

$$\text{ЗП} + \text{А} + \text{Витр. на ресурси} = 250\,000 + 100\,000 + 400\,000 = 750\,000 \text{ грн}$$

$$\text{Ціна} = 750\,000 \text{ грн (max. собівартість)}$$

$$\text{Прогнозована ціна} = 750\,000 \text{ грн} \cdot 1,03 = 772\,500 \text{ грн}$$

Всі розрахунки узагальнюємо в таблиці.

Таблиця 4.3.2 - Узагальнені результати ціноутворення

Метод ціноутворення	Прогнозна ціна	Плановий прибуток	Максимально допустима собівартість
Витратний	772 500 грн	22 500	750 000 грн
Агрегатний	784 860 грн	22 860	762 000 грн
Параметричний	775 125 грн	99 637	675 488 грн
Конкурентний	895 525 грн/од	111 040	784 485 грн
На підставі точки беззбитковості	772 500грн		750 000 грн
Оптимальні величини	800 102 грн	55 707,4	744 394, 6 грн

За розрахунками можна визначити, що конкурентний метод ціноутворення є найбільш близьким по собівартості за оптимальними величинами. Це дає можливість удосконалити саму розробку або ж купити більш сучасне обладнання чи найняти більше висококваліфікованих робітників. Максимально допустима собівартість становить 784 485 грн.

Для виведення об'єкту маркетингу за темою наукового дослідження на ринок потрібне фінансування, джерела яких та частку наводимо в таблиці 2.3.

Таблиця 4.3.3 – Джерела фінансування на процеси розвитку та частка фінансування в очікуваній сумі

Бізнес-процес	Сума бажаного фінансування	Період бажаного фінансування	Джерело бажаного фінансування	Частка джерела у очікуваній сумі
Аналіз ринку, наукових розробок та досліджень (теоретичні дослідження)	90 000 грн	3 місяці	Я, науковий керівник, КПП	9,3%
Виконання лабораторних експериментів	784 485 грн (виконання дослідження,	1 рік	Фінансові інвестиції «Укроргсинтез»	80,4%

та досліджень (експериментальні дослідження)	найнятий робітник, обладнання, реактиви)		вул. Черчилля Вінстона, 85 м. Київ,	
Просування та розповсюдження розробки	100 000 грн	3 місяці	Фінансові інвестиції	10,3%

Джерела інвестиції: виробництва фармацевтичного засобу, якими буде придбана розробка (технологія виробництва). Розробка має ключові фактори успіху такі як «економія часу» та «економія витрат», яких не мають інші учасники ринку, тому є шанс зацікавити виробників партизанів та тих, що діють на флангах.

4.4. Дослідження ринку

4.4.1 Анкета для збору первинної інформації

Анкета потенційного споживача

1. Загальна інформація

1.1 Ваше ім'я: _____

1.2 Ваша професійна діяльність:

- ☐ Сільське господарство
- ☐ Біотехнології
- ☐ Медицина
- ☐ Наука/Дослідження
- ☐ Інше (вказіть): _____

1.3 Чи є у вас досвід роботи з регуляторами росту рослин або антимікробними засобами?

- ☐ Так
- ☐ Ні

2. Застосування 12-ОФДК

2.1 Які властивості 12-ОФДК вам найбільш цікаві? (можна обрати кілька варіантів)

- ☐ Стимуляція росту рослин
- ☐ Відновлення рослин після стресу (наприклад, вплив важких металів)
- ☐ Антимікробна активність
- ☐ Інше (вказіть): _____

2.2 Чи зацікавлені ви у використанні 12-ОФДК у вашій роботі?

- ☐ Так, планую використовувати
- ☐ Можливо, потрібна додаткова інформація
- ☐ Ні

2.3 Якщо ви працюєте в сільському господарстві, чи використовуєте ви регулятори росту рослин або засоби для відновлення після стресу?

- ☐ Так (вказіть, які): _____
- ☐ Ні

3. Оцінка потреб

3.1 Який обсяг продукту вам міг би бути цікавий?

- ☐ Малий (для досліджень або тестування)
- ☐ Середній (для локального використання)
- ☐ Великий (для масштабного застосування)

3.2 У якій формі продукт був би для вас зручним?

- Порошок
- Розчин

3.3 Які критерії є найважливішими при виборі продукту?

- Ефективність
- Ціна
- Простота використання
- Екологічність
- Інше (вказіть): _____

4. Контактна інформація (за бажанням)

4.1 Якщо ви бажаєте отримати додаткову інформацію про 12-ОФДК або співпрацювати з нами, залиште, будь ласка, свої контактні дані:

- Телефон: _____

- Email: _____

5. Додаткові коментарі або пропозиції:

Дякуємо за ваш час і допомогу у розвитку нового продукту!

4.4.2. Оптимальна технологію продажу, канали просування і розповсюдження продукту

Таблиця 4.4.1 Методи просування на ринок

Метод просування	Об'єкт просування	Мета просування	Засіб просування	Переваги	Недоліки
Пропаганда	Хімічно-активні речовини	Залучення споживачів	ЗМІ, сарафани, радіо	Розширення спектру клієнтської бази	Збільшення витрат
Реклама	Технологія, результати дослідження.	Залучення споживачів, підвищення рейтингу розробки	Конференції, наукові журнали	Може працювати на велику аудиторію, публікації підвищують впізнаваність автора	Витрати, відсутній зворотній зв'язок
Стимулювання збуту	Технологія, результати дослідження.	Залучення споживачів, перехоплення клієнтів, підвищення рейтингу розробки	Виставки, конференції	Доступність	Великі витрати
Особистий продаж	Технологія, результати дослідження	Налагодження ділових відносин, партнерства або інвесторства	Особиста зустріч/ розмова/ переписка	Зворотній зв'язок, контакт зі споживачем	Забирає багато часу
	Угода				
Інтернет-маркетинг	Технологія, результати дослідження, авторські досягнення	Ознайомлення з брендом/ розробником, набір цільової аудиторії та залучення нових клієнтів	Соціальні мережі	Доступність, охоплення великої кількості людей	Забирає багато часу та не факт що буде якийсь відгук

Таблиця 4.4.2 Розрахунки вартості методів просування

Метод	Засіб	Прогнозні витрати	Вартість,
-------	-------	-------------------	-----------

просування	просуванн я	Основні засоби		Оборотні засоби				Мож ливі неро зпод ілені витр ати	грн/рік
				Оборотн іфонди		Розрахунки			
		Назва	грн	Назва	грн	Назва	грн		
Пропаганда	ЗМІ, сарафанне радіо	Посте -ри	12 000	-	-	Трансляц ія на радіо та телебаче ні	14 000	-	26 000
Реклама	Буклети, брошури, наукові журнали	Нем. акт иви	20 000	-	-	-	-	-	20 000
Стимулюва ннязбуту	Експозиції в місцях продажу, спеціалізо вані виставки	Нем.а ктиви, інвент а р, оренд а прим.	18 000	-	-	-	-	-	18 000
Особистий продаж	Індивідуал ьне спілкуван ня	Нем.а ктиви	5000	-	-	-	-	-	5 000
Інтернет- маркетинг	Таргетова на реклама в соц.мер.	Нем.а ктиви	15000	Елект роене ргія	35000	-	-	-	18 500

Таблиця 4.4.3 Розповсюдження розробки на ринку

Цільовий ринок	Об'єкт розповсюдження	Цільовий сегмент споживачів	Канал розповсюдження		Переваги	Недоліки
Олігополістичний ринок (особистий продаж)	Технологія, результати дослідження	Вузькопрофільне масове виробництво	Жорсткий	Виставки і конференції, виробництво	Демонстрація розробки, близький контакт із споживачами, контроль над збутовим процесом, якістю продукції і ціною	Великі витрати

			М'я- кий	Договір- ний	Партнерство та довіра, наявність договору з чіткими умовами	Втрачається безпосеред- ний контакт зі своїми споживача- ми, погіршує- ться якість зворотного зв'язку
		Мале підприємст- во	Жорс- ткий	Виставки і конференц ії, виробницт- во	Демонстрація розробки, повніше задовольняються потреби клієнтів в кількості, швидкості і сервісі, контроль над збутовим процесом, якістю продукції і ціною	Збільшення витрат на додаткові ресурси
			М'я- кий	Договір- ний	Партнерство та довіра, наявність договору з чіткими умовами	Втрачається безпосеред- ний контакт зі своїми споживача- ми, погіршує- ться якість зворотного зв'язку

Можна зробити висновок, що для малих підприємств ефективнішим є жорстке розповсюдження з безпосереднім контактом зі споживачем, а для великого підприємства більш ефективними є жорсткі методи розповсюдження адже за стратегією стимулювання збуту продукту важливим є охопити і розповсюдити розробку

ВИСНОВКИ

1. Біосинтетичний шлях утворення 12-ОФДК та інших жасмонатів відбувається в хлоропластах рослин шляхом перебігу трьох послідовних процесів, які каталізуються ферментами ацилгідроксилаз.

2. Протокол біокаталітичного синтезу 12-ОФДК, що складається з трьох послідовних реакцій в одному реакторі відповідає схемі біосинтетичного шляху: перша реакція відбувається за використання ліпооксигенази з сої, дві наступні за використання генетично модифікованого цільноклітинного каталізатора. Температура процесу близько +2 °C, барботування киснем.

3. Виявлено бактерицидну дію відносно грампозитивної бактерії *B. subtilis*, фунгіцидну відносно дріжджоподібного грибка *C. albicans* та толерантність у грамнегативної *E. coli*. Толерантність до кишкової палички можна пояснити використанням саме цього біологічного виду в якості продуцента двох ензимів (цільноклітинного каталізатора)

4. Проведенню цитотоксичне і генотоксичне дослідження за методом *Alium cepa* по відновленню клітин корінців цибулі у умовах кадмієвого стресу за обробки розчином 12-ОФДК, яке показало, що вплив Cd у концентрації 10 мкМ призводить до значного цитотоксичного та генотоксичного стресу, що супроводжується зниженням МІ на 20% порівняно з контролем та помітним пошкодженням клітин.

5. Регенерація меристематичної тканини коренів за дії 12-ОФДК залежала від дози та часу, більш сприятливі показники відновлення спостерігалися через 12 днів. Найбільш значне посилення росту коренів та поділу клітин було зафіксовано за концентрації 12-ОФДК 10 мкМ.

6. Виконано економічні розрахунки по стартап-проекту біокаталітичного синтезу 12- ОФДК, що показало що основними варіантами розвитку є контакти з потенційними клієнтами, сайт з інформацією про 12-ОФДК, блог у соціальних мережах

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. R. A. Creelman and J. E. Mullet, *Annual Review of Plant Physiology*, 1997, 48, 355–381.
2. L. Guan, N. Denkert, A. Eisa, M. Lehmann, I. Sjuts, A. Weiberg, J. Soll, M. Meinelcke and S. Schwenkert, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2019, 116, 10568–10575.
3. C. Wasternack and B. Hause, *Nature Plants*, 2019, 5, 776–777.
4. I. Stenzel, B. Hause, O. Miersch, T. Kurz, H. Maucher, H. Weichert, J. Ziegler, I. Feussner and C. Wasternack, *Plant Molecular Biology*, 2003, 51, 895–911.
5. D. Maynard, H. Gröger, T. Dierks and K. J. Dietz, *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69, 5341–5354.
6. H. Cheong, I. Barbosa dos Santos, W. Liu, H. N. Gosse and S. W. Park, *Plant Signaling & Behavior*, 2017, 12, e1362520..
7. P. A. Grieco and N. Abood, *Journal of Organic Chemistry*, 1989, 54, 6008–6010.
8. D. Maynard, S. M. Müller, M. Hahmeier, J. Löwe, I. Feussner, H. Gröger, A. Viehhauser and K. J. Dietz, *Bioorganic and Medical Chemistry*, 2018, 26, 1356–1364..
9. R. K. Hughes, E. J. Belfield, R. Ashton, S. A. Fairhurst, C. Göbel, M. Stumpe, I. Feussner and R. Casey, *FEBS Letters*, 2006, 580, 4188–4194
10. A. Nickel, T. Ung, G. Mkrtumyan, J. Uy, C. W. Lee, D. Stoianova, J. Papazian, W. H. Wei, A. Mallari, Y. Schrodi and R. L. Pederson, *Topics in Catalysis*, 2012, 55, 518–523..
11. S. Deepthi and K. Satheeshkumar, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2017, 101, 545–558.
12. I. Feussner and C. Wasternack, *Annual Review of Plant Physiology*, 2002, 53, 275–297
13. A. Kajiwara, T. Abe, T. Hashimoto, H. Matsuura and K. Takahashi, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2012, 76, 2325–2328.

14. T. B. Le, C. S. Han, K. Cho and O. Han, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2017, 1523–1529..
16. W.-C. Song, C. D. Funk and A. R. Brash, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993, 90, 8519–8523.
16. a) C. Wasternack, *Ann. Bot.*, 2007, 100, 681–697; (b) C. Delker, I. Stenzel, B. Hause, O. Miersch, I. Feussner and C. Wasternack, *Plant Biol.*, 2006, 8, 297–306.
17. D. S. Lee, P. Nioche, M. Hamberg and C. S. Raman, *Nature*, 2008, 455, 363–368.
18. J. Ziegler, I. Stenzel, B. Hause, H. Maucher, M. Hamberg, R. Grimm, M. Ganai and C. Wasternack, *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275, 19132–19138.
19. K. Ziegler and H.-G. Gellert, *Verfahren zur Herstellung von Aluminiumtri-alkylen und Aluminiumalkylhydriden (Direktsynthese von Aluminiumalkylen)*, DBP961537, 1957.
20. J. Britton, C. L. Raston and G. A. Weiss, *Chemical Communications*, 2016, 52, 10159–10162..
21. R. Porta, M. Benaglia and A. Puglisi, *Organic Process Research and Development*, 2016, 20, 2–25
22. B. H. Lipshutz, S. Ghorai, A. R. Abela, R. Moser, T. Nishikata, C. Duplais, A. Krasovskiy, R. D. Gaston and R. C. Gadwood, *J. Org. Chem.*, 2011, 76, 4379–4391.
23. A. Tušek, A. Šalić, Ž. Kurtanjek and B. Zelić, *Engineering in Life Sciences*, 2012, 12, 49–56.
24. N. Adebar, J. E. Choi, L. Schober, R. Miyake, T. Iura, H. Kawabata and H. Gröger, *ChemCatChem*, 2019, 11, 5788–5793.
25. Arya and Mukherjee, 2014; Rank and Nielsen, 1993; Rajeshwari et al., 2016
26. PROTEIN PROFILE AND ANTIFUNGAL PROPERTIES OF LYOPHILIZED SNAIL MUCUS: AN ACTIVE COMPONENT IN COSMETICS AND PHARMACEUTICAL FORMULATIONS Khrokalo L.A., Darmenko M. V., Volova U.F