

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ КЛІТИНИ

СМУТОК ОЛЕГ ВОЛОДИМИРОВИЧ



УДК 579.6: 577.152.1+549.9: 661.746.2

**L- і D-ЛАКТАТ-СЕЛЕКТИВНІ ОКСИДОРЕДУКТАЗИ, РЕКОМБІНАНТНІ
КЛІТИНИ ДРІЖДЖІВ *Ogataea polymorpha* ТА НАНОРОЗМІРНІ МАТЕРІАЛИ
ДЛЯ РОЗРОБКИ НОВИХ ЕНЗИМАТИЧНИХ І БІОСЕНСОРНИХ ПІДХОДІВ
КІЛЬКІСНОГО АНАЛІЗУ МОЛОЧНОЇ КИСЛОТИ**

03.00.07 – мікробіологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Львів – 2019

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано у відділі аналітичної біотехнології
Інституту біології клітини НАН України

Науковий консультант: доктор біологічних наук, професор
Гончар Михайло Васильович,
Інститут біології клітини НАН України,
завідувач відділу аналітичної біотехнології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України
Іваниця Володимир Олексійович,
Одеський національний університет ім. І.І. Мечнікова,
проректор з наукової роботи, професор кафедри
мікробіології, вірусології та біотехнології

доктор біологічних наук, професор,
Варбанець Людмила Дмитрівна,
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного
НАН України,
завідувач відділу біохімії мікроорганізмів

доктор біологічних наук
Осташ Богдан Омелянович,
Львівський національний університет ім. І. Франка,
старший науковий співробітник лабораторії генетики,
селекції та генетичної інженерії продуцентів антибіотиків,
професор кафедри генетики та біотехнології

Захист відбудеться “05” червня 2019 р. о 15⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д35.246.01, Інститут біології клітини НАН України, 79005, м. Львів, вул. Драгоманова, 14/16.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біології клітини НАН України за адресою: 79005, м. Львів, вул. Драгоманова, 14/16.

Автореферат розісланий “30” квітня 2019 р.

Учений секретар спеціалізованої вченої ради, к.б.н.



Т.М. Прокопів

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Молочна кислота (лактат) існує у формі двох стереоізомерів, L- і D-лактату. Лактат відіграє важливу роль у живих організмах та багатьох технологічних просесах. В інтенсивній терапії і хірургії визначення вмісту лактату є важливим для оцінки стану пацієнта. Підвищення рівня лактату у крові є основним індикатором ішемічного стану, причинами якого можуть бути різні типи шоку, серцева недостатність, гіпоксія, отруєння Карбон монооксидом чи ціанідом [Yang *et al.*, 1997]. Зміни вмісту лактату також можуть бути наслідком діабету або патологічного всмоктування жирних кислот у товстому кишківнику [Bleiberg, 1991]. У спортивній медицині аналіз L-лактату дозволяє визначити пороговий фізіологічний рівень підготовки спортсмена і підібрати оптимальні режими навантаження.

У нормальному фізіологічному стані L-лактат є переважаючим енантіомером в крові ($750-2000 \text{ мкмоль}\cdot\text{л}^{-1}$), тоді як вміст D-лактату знаходиться на низькому рівні ($13-90 \text{ мкмоль}\cdot\text{л}^{-1}$) [Binding Ling *et al.*, 2012]. D-лактат, як аналіт, став актуальним порівняно недавно. З'ясувалося, що екзогенний D-лактат у підвищеній концентрації є токсичним для дітей та дорослих із синдромом короткого кишківника і погіршує стан хворих на енцефалопатію, у зв'язку з чим виникає необхідність контролювати вміст D-лактату у ферментованих продуктах (як побічний продукт ферментації глюкози небажаною мікрофлорою). Крім того, D-лактат розглядається як потенційний маркер тяжкості цукрового діабету, оскільки він накопичується в сироватці крові внаслідок посилення шунтового шляху метаболізму тріозофосфатів до метилглюксалу та відновлення останнього до D-молочної кислоти. Встановлено, що підвищення вмісту D-лактату в сироватці крові пов'язане з кетоацидозом, а не гіперглікемією [Christopher *et al.*, 1995]. Припускають, що метаболізм кетонів за участю цитохромів печінки може бути основним джерелом метилглюксалу у хворих цукровим діабетом. У них удвічі вищий рівень D-лактату порівняно зі здоровими людьми - $28 \text{ мкмоль}\cdot\text{л}^{-1}$ і $13 \text{ мкмоль}\cdot\text{л}^{-1}$, відповідно [Hasegawa *et al.*, 2003]. У хворих на діабет спостерігається також підвищена активність ферментів, залучених в метаболізмі глюксалу, - альдозоредуктази, глюксалази I і глюксалази II [Ratliff *et al.*, 1996]. Ускладнення при цукровому діабеті включають ретинопатії [Thornalley *et al.*, 1989], нефропатії [Gross *et al.*, 2005] і нейропатії [Thornalley, 2002], спричинені продуктами метаболізму метилглюксалу. Клінічно, D-лактат відіграє важливу роль у формуванні ускладнень у діабетичних пацієнтів [Phillips *et al.*, 1993], тому цей метаболіт може бути використаний як маркер цукрового діабету.

Однак важливість визначення вмісту лактату не лімітується лише медичним сектором. Лактат є компонентом багатьох харчових продуктів і напоїв. Молочно-кислі бактерії природньо продукують L- і D-лактат, тому останні є присутніми в багатьох ферментованих молочних продуктах - таких як йогурт, кисле молоко, сири, також ферментованих овочах. L-лактат часто додають до харчових продуктів - для підкреслення смаку, як підкислювач та консервуючий агент. Підвищення вмісту лактату у продуктах є ознакою їх псування [Ackland *et al.*, 1984]. Якість молока, пива, вина, фруктових і овочевих соків можна оцінити, визначаючи вміст L- і D-лактату.

Відомі на сьогодні ензиматичні підходи аналізу L- та D-лактату базуються на використанні бактерійної NAD^+ -залежної лактатдегідрогенази (ЛДГ) або бактерійної лактатоксидази (ЛО) (у випадку визначення L-енантіомеру). Описані методи на основі NAD^+ -залежної ЛДГ мають низку недоліків: неабсолютна селективність, необхідність використання екзогенного кофактора та додаткових піруват-зв'язуючих реагентів (гідразину або 2-аміно-2-метил-1,3-пропанодіолу) чи ферменту (глутамат-піруваттрансaminaзи), що додатково підвищує вартість методів та ускладнює процедуру аналізу. Методи на основі ЛО вимагають проведення складної процедури підготовки зразків та є досить дорогими. Водночас, відомі мітохондріальні дріжджові ферменти - L-лактат:ферицитохром c-оксидоредуктаза (КФ 1.1.2.3; флавоцитохром b_2 , ФЦ b_2) і D-лактат:ферицитохром c-оксидоредуктаза (КФ 1.1.2.4, DLDH). Ці білки у дріжджів кодуються генами *CYB2* і *DLD1*, відповідно. ФЦ b_2 , отриманий із *Saccharomyces cerevisiae* та *Hansenula anomala*, – мембрано-зв'язаний гомотетрамер, кожна субодиниця якого містить по одній молекулі флавінмононуклеотиду (ФМН) і протогему IX. DLDH – інтегральний мембранний білок - гомодимер, кожна субодиниця якого містить по одній молекулі флавінаденіндинуклеотиду (ФАД) і Zn^{2+} . ФЦ b_2 і DLDH, завдяки своїм унікальним каталітичним властивостям (абсолютна специфічність до L- чи D-енантіомеру, відсутність у потребі екзогенного кофактора) мають важливе біоаналітичне значення, оскільки можуть замінити NAD^+ -залежну ЛДГ або бактерійну ЛО при визначенні вмісту L- та D-лактату в біологічних рідинах та харчових продуктах за допомогою ензиматичних та біосенсорних підходів. Широке використання цих ферментів із дріжджів *S. cerevisiae* у біоаналітиці гальмується високою їх лабільністю та складністю процедури виділення.

В останні роки особливий інтерес викликає використання нано- та мікро-розмірних матеріалів, особливо у поєднанні із біоселективними елементами – ферментами, для розробки технологій одержання біонаноматеріалів із каталітичними властивостями [Holzinger *et al.*, 2014]. Це зумовлюється тим, що однією з основних особливостей нано- та мікро-розмірних матеріалів (НЧ та МЧ) є висока хімічна активність, що обумовлена їх підвищеною здатністю до іонного чи атомного обміну, адсорбції на різноманітних поверхнях, до утворення поверхневих зв'язків із іншими адсорбуючими частинками та ін. Відомо, що найважливішою перевагою НЧ та МЧ є їх розмір, а також пов'язані з цим специфічні властивості: велика питома площа поверхні, можливість перенесення молекул у тканини чи клітини, що захищає їх від біодеградації, та вивільнення упродовж тривалого часу, локальність дії та специфічність взаємодії з біологічними молекулами [Черноусова *і ін.*, 2012]. При хімічному синтезі НЧ використовують різноманітні варіанти, що відрізняються типом реагента і системи, в якій здійснюється процес [Vegeera *et al.*, 2006]. Проста методика синтезу НЧ, а також їх специфічне зв'язування багатьох біологічних молекул робить їх привабливими кандидатами для досліджень у сенсорних технологіях. Це дає змогу створення біочастинок (імобілізованих ферментів на поверхні НЧ та МЧ) із подальшим використанням у біосенсоріці, а також в ензиматичному аналізі.

Беручи до уваги актуальність вищезгаданих проблем, основну увагу в дисертаційній роботі було приділено конструюванню продуцентів стабільних форм ФЦ b_2 та DLDH, їх виділенню, очистці та характеристиці, їх поєднанню із наноносіями та розробці на основі отриманих біонаномолекул нових селективних біореакторів, ензиматичних та біосенсорних підходів аналізу вмісту лактату, придатних для використання у клінічній діагностиці, фармацевтиці, спортивній медицині та харчових технологіях.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є результатом досліджень, проведених автором на базі відділу аналітичної біотехнології Інституту біології клітини НАН України, в якому одним із напрямків досліджень є розробка ензиматичних та біосенсорних підходів для аналізу вмісту практично важливих аналітів у біологічних рідинах, бродильних культурах, харчових продуктах та середовищах довкілля. Дисертаційна робота відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу і виконувалась в рамках бюджетних тем: “Створення нових біоаналітичних систем на основі оксидоредуктаз” (№ держреєстрації 0106U002598, 2006-2008 рр.), “Вивчення біорозпізнаючих властивостей мікро- і нанорозмірних об'єктів на основі ферментів та генетично модифікованих клітин з метою розробки нових біоаналітичних методів” (№ держреєстрації 0113U000142, 2009-2012 рр.), “Розробка нових біоаналітичних методів визначення вмісту L- і D-лактату та L-аргініну для діагностики деяких захворювань, контролю їх перебігу” (№ держреєстрації 0109U000118, 2013-2015 рр.), спільної програми наукових проектів НАН України та УНТЦ ”Генетична і білкова інженерія оксидоредуктаз з метою конструювання біонанорозмірних об'єктів аналітичного призначення. Генетичне конструювання надпродуцентів, очистка, стабілізація модифікованих ферментів та отримання біоселективних мембран на основі наноносіїв” (№ держреєстрації 0107U008204, 2007-2009 рр.), комплексної програми фундаментальних досліджень НАН України “Дослідження в галузі сенсорних систем та технологій” та цільової програми наукових досліджень НАН України: “Розробка біо/хемосенсорних аналізаторів для визначення вмісту формальдегіду, L- та D-лактату, їх метрологічна оцінка та дослідна апробація” (№ держреєстрації 0113U002554, 2013-2016 рр.), українсько-литовського проекту ”Дослідження L- та D-лактат: цитохром *c*-оксидоредуктаз, виділених із рекомбінантних штамів дріжджів *Hansenula polymorpha*, і їх використання для конструювання амперометричних біосенсорів” (№ держреєстрації 0115U001971, 2014-2015 рр.). Автор дисертаційної роботи є одним із виконавців вищезгаданих досліджень.

Робота виконувалась також у рамках міжнародного наукового гранту INTAS FOOD CALL 00-0715 “Novel technology for fermentation process monitoring and quality control of alcoholic beverages based on enzyme electrodes and kits”, гранту CRDF UKB2-9044-LV-10 “Production of trial series and preparation of technical documentation for bioanalytical kit for enzymatic analysis of L-lactate in clinical diagnostics and beverage industries” та міжнародних індивідуальних проектів: INTAS for Young Scientists OPEN CALL 2005 Nr. 05-109-5207 “Construction of flavocytochrome b_2 -overproducing strain by the use of *CYB2* gene-containing expression cassette,

bioanalytical application of the recombinant enzyme as a bioselective element of an analytical kit and amperometric sensor”; FEMS-2006 (I) “Application of cells of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* and enzyme from this source for development of new L-lactate selective bioanalytical approaches” та West-Ukrainian BioMedical Research Center (WUBMRC-2006) “Development of a novel L-lactate selective enzymatic kit based on flavocytochrome b_2 from methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* and its biomedical testing”.

Мета і завдання дослідження. Метою даної роботи було з’ясувати потенціал поєднання генно-інженерних підходів і нанотехнологій для створення нових селективних біоаналітичних методів кількісного аналізу L- та D-молочної кислоти, придатних для використання у клінічній діагностиці, фармацевтиці, спортивній медицині та харчових технологіях.

Відповідно до мети, були поставлені наступні завдання:

1. За допомогою генно-інженерних підходів, на основі термотолерантних метилотрофних дріжджів *Ogataea (Hansenula) polymorpha*, сконструювати стабільні рекомбінантні надпродуценти ферментів селективних до L- та D-лактату та оптимізувати умови їхнього синтезу.

2. Опрацювати метод виділення та очищення ФЦ b_2 і DLDH із клітин надпродуцентів *O. polymorpha*. Провести фізико-хімічну та ензимологічну характеристику очищених ферментних препаратів.

3. На основі очищеного ФЦ b_2 та рекомбінантних клітин *O. polymorpha* – надпродуцентів DLDH створити лабораторні прототипи біореакторів для конверсії рацемату молочної кислоти до оптично чистого D-ізомера та усунення токсичного D-лактату в модельних сумішах.

4. Розробити нові, прості та надійні ензиматично-фотометричні методи аналізу L- та D-лактату за використання стереоселективних ферментів, клітинних уламків та клітин сконструйованих рекомбінантних штамів *O. polymorpha*.

5. Дослідити можливість використання магнітних мікрочастинок для реутилізації фермента в складі ензиматичного набору для аналізу L-лактату.

6. Розробити нові методи формування нонорозмірних носіїв *in situ* на основі золота та провести їх фізико-хімічну і структурну характеристику.

7. Дослідити можливість поєднання генетичної інженерії та нанотехнологій для покращення основних операційних характеристик мікробного біосенсора на L-лактат.

8. На основі очищених препаратів ферментів, субклітинних фракцій, клітинних уламків та клітин штамів-надпродуцентів ФЦ b_2 і DLDH *O. polymorpha* сконструювати і охарактеризувати нові ензимні та мікробні амперометричні біосенсори з покращеними біоаналітичними характеристиками.

9. Дослідити можливість використання препаратів ФЦ b_2 для неінвазійного ензиматичного та біосенсорного моніторингу вмісту лактату в біологічних рідинах людини (поті, слині).

10. Провести апробацію розроблених біоаналітичних підходів аналізу L- та D-лактату на реальних зразках рідин людини, харчових продуктів та фармацевтичних препаратів.

Об'єкт дослідження: надпродуценти термостабільної форми ФЦ b_2 та DLDH *Ogataea polymorpha*, ферментні препарати L- і D-селективних оксидоредуктаз, нанорозмірні ензимні матеріали, їх структурні та фізико-хімічні властивості.

Предмет дослідження: гени *O. polymorpha*, що визначають надпродукцію ФЦ b_2 та DLDH, регуляція синтезу ферментів, створення біореакторів для конверсії L- та D-лактату, конструювання ензиматичних та біосенсорних аналітичних підходів визначення вмісту L- та D-лактату.

Методи досліджень. У роботі використано різноманітні генно-інженерні, мікробіологічні, біохімічні, фізико-хімічні, електрохімічні, аналітичні та біосенсорні методи дослідження. Для конструювання рекомбінантних векторів використано молекулярно-біологічні методи, зокрема: рестрикція ДНК, затуплення липких кінців лінеаризованих фрагментів ДНК, дефосфорилування лінеаризованих векторів, лігування вектора із вставкою та генетична трансформація клітин дріжджів, ПЛР-аналіз. При аналізі активності ферментів та чистоти ферментних препаратів використано методи спектрофотометричного аналізу, електрофорезу білків за нативних та денатуруючих умов, іонообмінна та афінна хроматографія. Для фізико-хімічного та структурного аналізу наноосіїв використано методи сканувальної електронної мікроскопії, рентгеноспектрального аналізу, атомно-силової мікроскопії та трансмісійної електронної мікроскопії. При конструюванні амперометричних біосенсорів використано циклічну вольтамперометрію, імпульсну амперометрію, хроноамперометрію, статистичний і кореляційний аналіз.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше сконструйовано рекомбінантні штами дріжджів *O. polymorpha*: «tr1» (*gcr1 catX CYB2*) – надпродуцент ФЦ b_2 , що характеризується восьмикратним підвищенням питомої активності відповідного ферменту, та штаму *O. polymorpha* «tr6» (*gcr1 catX cyb2Δ/DLD1*) – продуцент DLDH, який не виявляє активності ФЦ b_2 , водночас, володіє шестикратною питомою активністю DLDH, порівняно з вихідними батьківськими штамами. Проведено підбір складу культурального середовища та інших параметрів для максимальної продукції цільових ферментів сконструйованими продуцентами *O. polymorpha*. Уперше запропоновано використати амінопропілсилохром, модифікований цитохромом *c* в ролі ліганда, як носій афінної хроматографії для очищення ФЦ b_2 із екстрактів клітин штаму дріжджів *O. polymorpha* «tr1». Розроблено схему очищення DLDH із клітин штаму *O. polymorpha* «tr6». На основі очищеного ФЦ b_2 та клітин *O. polymorpha* «tr6» уперше створено лабораторні прототипи колонкових біореакторів для конверсії рацемату молочної кислоти до оптично чистого D-ізомера та усунення токсичного D-лактату, відповідно. Уперше розроблено новий ензиматично-фотометричний метод кількісного аналізу L-лактату за використання рекомбінантного ФЦ b_2 та «Берлінської блакиті» та опрацьовано спосіб реутилізації фермента для визначення вмісту L-лактату за використання ФЦ b_2 , іммобілізованого на магнітних мікрочастинках. Опрацьовано новий ензиматично-фотометричний метод аналізу D-лактату на основі використання клітин та субклітинних фракцій *O. polymorpha* «tr6» (як каталітичних елементів) та утворення формагану як кінцевого кольорового продукту. Уперше запропоновано новий метод формування золотих наночастинок

на поверхні робочого планарного електроду *in situ* та розроблено на його основі новий ензимний безмедіаторний амперометричний біосенсор «третього покоління» на L-лактат. Уперше використано поєднання генетичної інженерії та нанотехнологій при формуванні клітинного біоселективного елементу амперометричного біосенсора на L-лактат. Показано, що збагачення клітин *O. polymorpha* ФЦ b_2 за рахунок надекспресії відповідного гена та додаткового введення в клітини золотих наночастинок з іммобілізованим ферментом суттєво покращує основні операційні характеристики біосенсора. Вперше розроблено та охарактеризовано нові мікробні біосенсори на D-лактат з використанням клітинних уламків, субклітинної фракції, збагаченої мітохондріями, та клітин рекомбінантного штаму *O. polymorpha* «tr6». Завдяки делеції гена *CYB2*, кодуючого L-лактат-селективний флавоцитохром b_2 , показано, що створені мікробні біосенсори характеризуються високою селективністю до D-енантіомера лактату. Уперше використано препарати ФЦ b_2 для неінвазійного ензиматичного та біосенсорного моніторингу вмісту лактату в біологічних рідинах людини (поті та слині).

Практичне значення одержаних результатів. Отримано стабільні штами *O. polymorpha* - продуценти термостабільного ФЦ b_2 і DLDH та очищені препарати відповідних ферментів, придатні для біоаналітичного використання.

Опрацьовано нові ензиматично-фотометричні методи та відповідні біоаналітичні набори для визначення вмісту L- та D-лактату; біореактори для біотрансформації енантіомерів лактату, а також прототипи ензимних та мікробних біосенсорів на основі очищених препаратів ферментів, субклітинних фракцій, клітинних уламків та клітин надпродуцентних штамів дріждів.

Розроблено новий метод формування золотих наночастинок на поверхні робочого планарного електроду *in situ* та лабораторний прототип біосенсора «третього покоління» на L-лактат.

Опрацьовано методи неінвазійного ензиматичного та біосенсорного моніторингу вмісту L-лактату в біологічних рідинах людини (поті та слині).

Результати амперометричних досліджень використано для створення експериментального зразка автоматичного амперометричного аналізаторного приладу «Форматест-2010».

За результатами виконання дисертаційної роботи одержано Патент США (№ PCT/US2008/069637) та Патент на корисну модель України (№ 45283 від 10.11.2009 р.), що стосуються розробки ензиматично-фотометричного набору для кількісного визначення L-лактату з використанням очищеного препарату ФЦ b_2 .

Особистий внесок здобувача. Авторіві належить формулювання головних завдань досліджень, вибір об'єктів, а також вибір методів дослідження та постановка експериментів. Визначення теми й мети роботи, а також обговорення результатів і підготовку до друку статей за результатами дисертаційної роботи здійснено спільно з науковим консультантом, д.б.н., проф. Гончаром М.В. Генно-інженерні дослідження проводились за консультування з д.б.н., с.н.с. Дмитруком К.В. та академіком НАН України, д.б.н., проф. Сибірним А.А. Експериментальні дослідження, результати яких викладені в дисертації, проведено спільно зі співавторами відповідних публікацій.

Апробація результатів дисертації. Основні положення роботи опубліковано у вигляді наукових статей у профільних журналах та представлено у формі тез усних або стендових доповідей на міжнародних наукових конференціях. Результати роботи доповідались на Центральноєвропейському конгресі науки про життя EUROBIOTECH (Krakow, Poland, 2010), V Форумі молодих вчених “RECOOP HST Bridges in Life Sciences” (Львів, Україна, 2010), IV Польсько-Українській Вайглівській мікробіологічній конференції (Wroclaw, Poland, 2011), I міжнародному симпозиумі “Non-Conventional Yeasts in the Postgenomic Era” (Львів, Україна, 2011), III з’їзді Українського товариства клітинної біології (Ялта, Україна, 2012), V Польсько-Українській Вайглівській мікробіологічній конференції (Чернівці, Україна, 2013), IV з’їзді Українського товариства клітинної біології (Ужгород, Україна, 2014), V міжнародній науковій конференції молодих учених „Human - Nutrition - Environment” “Biotechnology for sustainable development” (Rzeszow, Poland 2014), XXVII Міжнародній конференції з генетики та молекулярної біології дріжджів (Levico Terme, Italy, 2015), Міжнародній конференції "Актуальні проблеми клітинної біології та біотехнології" (Львів, Україна, 2015), V з’їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (Одеса, Україна, 2016), VII Польсько-Українській Вайглівській мікробіологічній конференції (Львів, Україна, 2017), III Міжнародній науковій конференції “Microbiology and Immunology – the Development Outlook in the 21st Century” (Київ, Україна, 2018), Міжнародній конференції “Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application” (Rzeszow, Poland, 2018), Міжнародній конференції “Advances in Microbiology and Biotechnology” (Львів, Україна, 2018).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 50 наукових праць, включаючи 20 статей у фахових виданнях (16 – у закордонних, з сумарним імпаکت фактором – 46 та 4 – у вітчизняних виданнях), 5 розділів монографій (4 – у закордонних та 1 – у вітчизняному виданні), 2 патенти (1 – патент США та 1 – патент України на корисну модель), 23 тез доповідей на міжнародних наукових конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація містить наступні розділи: «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали і методи досліджень», «Результати досліджень та їх обговорення», «Узагальнення результатів досліджень», «Висновки», «Список використаних джерел». Дисертацію викладено на 298 сторінках, із них основна частина займає 266 сторінок. Робота містить 105 рисунків, 26 таблиць і 247 джерел літератури.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

Огляд літератури. У цьому розділі викладено хімізм та ензимологію метаболізму лактату у дріжджів. Особлива увага приділена ензимологічній характеристиці та генетичній регуляції синтезу домінантних ферментів метаболізму лактату у дріжджів – L- та D-лактат:ферицитохром с-оксидоредуктаз. Проведено аналіз літератури та порівняно основні характеристики ензиматичних та біосенсорних методів визначення вмісту L- та D-лактату, зокрема, із використанням NAD-залежних лактатдегідрогеназ різного походження та бактерійної лактатоксидази.

Матеріали і методи досліджень. Дріжджові штами *O. polymorpha* культивували при 37 °С на багатому середовищі YPD [Ausubel *et al.*, 1990] або на мінеральному середовищі Беркгольдера [Шавловский *и др.*, 1978]. Бактерії *Escherichia coli* DH5 α вирощували при 37 °С на багатому середовищі LB [Ausubel *et al.*, 1990]. Агаризовані середовища для дріжджових і бактерійних штамів містили 1,5% агар.

Трансформацію дріжджів *O. polymorpha* та бактерій *E. coli* проводили методом електропорації як описано раніше [Faber *et al.*, 1994; Sambrook *et al.*, 2012]. Виділення сумарної ДНК з клітин дріжджів проводили як описано для *S. cerevisiae* [Wach *et al.*, 1994]. Виділення плазмідної ДНК, електрофорез ДНК в агарозному гелі, елюцію фрагментів ДНК з агарозного гелю, розщеплення ДНК рестриктазами, дефосфорилування кінців ДНК, затуплення «липких» кінців лінеаризованої ДНК за допомогою Т4 ДНК-полімерази, лігування лінеаризованих фрагментів ДНК, ампліфікацію фрагментів ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), аналіз ДНК методом гібридизації за Саузерном проводили згідно з роботою [Sambrook *et al.*, 2012]. Очистку ДНК проводили на колонках фірми «Quiagen» (США) (Quiagen PCR purification Kit). При ампліфікації фрагментів ДНК за допомогою ПЛР використовували синтетичні олігонуклеотидні праймери фірм «IDT Technologies» або «Sigma» (США).

У роботі використовувалась база даних *O. polymorpha* - <http://genome.jgi-psf.org/Hanpo2/Hanpo2.home.html>. Аналіз нуклеотидної послідовності ДНК проводили за допомогою програм: Oligonucleotide Properties Calculator [<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>]; NEBcutter V2.0 [<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>] та пакету програм доступних на <http://www.bioinformatics.org/sms/> і мережевого сервісу BLAST Національного центру біотехнологічної інформації (Bethesda, MD, USA), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

Біомасу дріжджів визначали спектрофотометричним методом на спектрофотометрі Helios γ ($\lambda = 600$ нм, кювета 1 см), розраховуючи суху вагу за калібрувальною кривою. Концентрацію білка в безклітинних екстрактах визначали методом Лоурі [Lowry *et al.*, 1951]. Визначення активності L- та D-лактат:ферицитохром *c*-оксидоредуктаз проводили за [Appleby *et al.*, 1959, Appleby *et al.*, 1960]. Активність алкогольоксидази визначали за кількістю продукованого пероксиду водню за 1 хв у перерахунку на 1 мг вологої маси пермеабілізованих клітин. Пероксид водню аналізували фотометрично за утворенням кольорового продукту пероксидазного окислення *o*-діанізидину [Gonchar *et al.*, 2002]. Визначення вмісту лактату в культуральному середовищі ензиматичним методом проводили за [Schon *et al.*, 1965]. Проведення нативного електрофорезу та виявлення білкових зон в ПААГ здійснювали за [Ornstein *et al.*, 1964]. SDS-електрофорез вели за [Laemmli, 1970]. Проявлення зон лактатдегідрогеназної активності L-лактат:ферицитохром *c*-оксидоредуктази (ФЦ *b*₂) проводили за роботою [Gaida *et al.*, 2003]. Субклітинні фракції клітин *O. polymorpha* (*gcr1 catX cyb2 Δ /DLD1*) отримували за модифікованою методикою Грегга [Gregg *et al.*, 2009].

Основою методу виділення та очищення ФЦ b_2 із клітин рекомбінантного штаму *O. polymorpha* «tr1» (*gcr1 catX CYB2*) послужив метод, розроблений для дріжджів *H. anomala* [Celerier et al., 1989]. За основу схеми виділення D-лактат:ферицитохром *c*-оксидоредуктази (DLDH) із клітин рекомбінантного штаму *O. polymorpha* «tr6» (*gcr1 catX cyb2Δ/DLD1*) послужив метод, описаний для дріжджів *S. cerevisiae* [Pohanka & Zboril, 2008]. Іонообмінна хроматографія проводилась на колонці (1,0 x 20 см) з ДЕАЕ–целюлозою Toyopearl 650 M (1-7-7 або TSK-GEL, Токіо, Японія). Елюцію проводили 15 % (від насичення при 0 °С) сульфатом амонію в 50 мМ фосфатному буфері, рН 7,8. Ступінь очищення цільового фермента від баластних білків характеризували, визначаючи його активність у фракціях елюатів та за допомогою електрофорезу в ПААГ у присутності SDS. Висолювання ферменту проводили додаванням до елюату сухого сульфату амонію до 70 % (від насичення при 0 °С). Спектри поглинання розчину ФЦ b_2 в нативній формі знімали на спектрофотометрі Shimadzu (Японія) у видимій ділянці світла (300 - 600 нм) в 1 см кварцевих кюветах об'ємом 2 мл. Для іммобілізації ФЦ b_2 методом іонних взаємодій на поверхні золотих наночастинок проводилась їх функціоналізація цистеаміном або використовувались комерційні магнітні мікрочастинки «BioMag® Plus particles» (Sigma-Aldrich) на основі оксиду заліза покриті силаном розміром 1 мкм та функціоналізовані аміногрупами.

Амперометричні біосенсори конструювали на базі трьохелектродної сенсорної конфігурації за допомогою комерційних амперометричних потенціостатів: "EP 30 Biometra", (Геттінген, ФРН), "Autolab" (PGSTAT302, Utrecht, Нідерланди), *CNI 1200A* (IJ Cambria Scientific Ltd, Порт Барі, Великобританія) або за допомогою експериментальних зразків потенціостатів „Postat-16” та „Biosens” (розроблених у співпраці із к.т.н. Ю.Г. Дубовим), з'єднаних з персональним комп'ютером для реєстрації та обробки результатів. Для вивчення операційної стабільності створені біоелектроди тестувались при 24 °С на автоматичному аналізаторі інжекційного типу “OLGA” (від англ. on-line general analyzer), розробленому в лабораторії проф. В. Шумана (Рурський університет, ФРН). Тестування зразків поту та слини людини проводилось за використання експериментального зразка автоматичної аналізаторної системи «Форматест-2010», розробленої у співпраці з к.т.н. Вусом Б.С. (ТзОВ „Науково-виробнича фірма „Інженерна Лабораторія” Лтд, Львів).

Іммобілізацію ферментів, субклітинних фракцій чи клітин рекомбінантних штамів *O. polymorpha* на поверхні робочих електродів проводили шляхом їх фіксації діалізною мембраною, утриманням комерційним катодним полімером GY 83-0270 005 BASF Coatings GmbH (Мюнстер, ФРН) або електроосадженням в шарі полімерів, синтезованих в лабораторії аналітичної хімії та електросенсорики Рурського університету (м. Бохум, ФРН) [Ngounou et al., 2004; Smutok et al., 2006].

Синтез золотих наночастинок (Au-НЧ) проводили за методом Сана [Sun et al., 2003]. Спектри поглинання отриманих наночастинок реєстрували на спектрофотометрі SHIMADZU UV-1650 PC (Кіото, Японія) в діапазоні довжини хвилі 250-800 нм. Сканувальна електронна мікроскопія і рентгеноспектральний аналіз зразків проводились на скануючому електронному мікроскопі „СЕМ-мікроаналізатор РЕММА-102-02” (Суми, Україна). Розмір і структуру Au-НЧ

досліджували на атомно-силовому мікроскопі P47-PRO (NT-MDT). Морфологічна характеристика Au-НЧ та клітин дріжджів, збагачених Au-НЧ із зв'язаним ФЦ b_2 , проводилась з використанням трансмісійного електронного мікроскопа РЕМ-100 (Суми, Україна).

Для кожної вибірки показників визначали середнє арифметичне значення (M), середнє квадратичне відхилення (σ). Для розроблених аналітичних методів обраховували коефіцієнт варіації (C_v , %). Розрахунок статистичних показників і побудову графіків проводили за допомогою програми Origin 7.5. Лінеаризацію графіків проводили за рівнянням регресії $Y = A + BX$ (A і B – параметри рівняння), розраховували коефіцієнт лінійної кореляції R та рівень достовірності зв'язку p (для події $R = 0$) [Деркач *и др.*, 1977].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Генно-інженерне конструювання штамів – продуцентів L- та D-лактат:ферицитохром с-оксидоредуктаз на основі дріжджів *O. polymorpha*

Конструювання штамів – продуцентів ФЦ b_2 *O. polymorpha*. У роботі використовували штами колекції Інституту біології клітини НАН України: *Ogataea polymorpha* 356 лінії DL1, *O. polymorpha* CBS 4732, *O. polymorpha* C-105 (*gcr1 catX*) [Gonchar *et al.*, 1998]. У вихідного штаму C-105 порушено глюкозну катаболітну репресію [Stasyk *et al.*, 2004], що забезпечує конститутивне функціонування промотора алкогольоксидази, а також пошкоджено ген каталази, що полегшує виділення цільового фермента без домішок каталази [Gonchar *et al.*, 2001]. Для конструювання і ампліфікації плазмід використовували штам *E. coli* DH5 α [Sambrook *et al.*, 1989].

Відкриту рамку трансляції (ВРТ) гена *CYB2* *O. polymorpha* разом із термінатором синтезували за допомогою ПЛР, використовуючи відповідні праймери і хромосомну ДНК *O. polymorpha* CBS 4732 як матрицю. Отриманий фрагмент, фланкований сайтами рестрикції *Hind*III і *Kpn*I, клонували перед промотором гена *AOX* *O. polymorpha* в вектор рНІРХ2 [Faber *et al.*, 1994]. В результаті, плазміда отримала назву рНІРХ2_СУВ2 (Рис. 1, А). Касету експресії, що містить промотор гена *AOX* і ВРТ *CYB2* з термінатором, ампліфікували за допомогою ПЛР, використовуючи праймери відповідні та вектор рНІРХ2_СУВ2 як матрицю. ПЛР-продукт, попередньо оброблений рестриктазою *Vam*HI, клонували у вектор рGLG61 [Sohn *et al.*, 1999]. Сконструйована плазміда отримала назву рGLG61_СУВ2 (Рис. 1, Б).

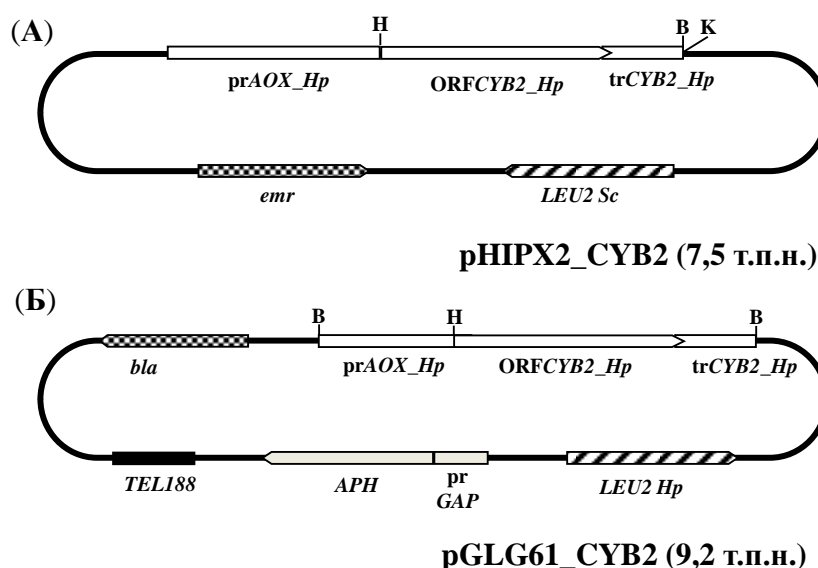


Рис. 1. Фізична карта плазмід pHIPX2_CyB2 (7,5 т.п.н.) (А) і pGLG61_CyB2 (9,2 т.п.н.) (Б). Касета експресії, що містить промотор гена *AOX*, ВРТ гена *CYB2* і термінатор *CYB2* *O. polymorpha*, позначена білою лінією. Гени *LEU2* *O. polymorpha* позначені заштрихованою лінією. Гени *emr* і *bla*, які забезпечують резистентність до еритроміцину і ампіциліну, позначені лінією в клітинку. Ген *APH*, що забезпечує стійкість до генетицину, поєднаний з ослабленим конститутивним промотором гена гліцеральдегідфосфатдегідрогенази (*GAP*), позначений сірою лінією. ARS-елемент *HARS36* (*TEL188*) – чорною лінією. Сайти рестрикції: Н – *Hind*III, В – *Bam*HI, К – *Kpn*I.

Плазміда pGLG61 містить домінуючий маркер – бактерійний ген *APH* (аміноглікозид-3-фосфотрансферази), експресія якого послаблена, і послідовність *HARS36* (*TEL188*), здатну до автономної реплікації. Такі складові забезпечують багатократну тандемну інтеграцію pGLG61 в теломерні ділянки хромосом *O. polymorpha* при селекції трансформантів на середовищі з антибіотиком генетицином (G418) [Sohn *et al.*, 1999]. Плазмиду pGLG61_CyB2, сконструйовану на основі вектора pGLG61 (Рис. 1, Б), трансформували в реципієнтний штам *O. polymorpha* C-105 (*gcr1*, *catX*). Трансформанти висівали на багате середовище із зростаючими концентраціями генетицину. Найвища концентрація генетицину, при якій ще виростили трансформанти, складала 1 мг·мл⁻¹. Отримані трансформанти стабілізували культивуванням за неселективних умов протягом десяти-дванадцяти генерацій з подальшим перенесенням на селективне середовище із генетицином. Наявність експресійної касети у стабільних трансформантів перевіряли за допомогою ПЛР, використовуючи відповідні праймери і хромосомну ДНК стабільних трансформантів у ролі матриці.

Первинний скринінг генетицин-резистентних трансформантів із підвищеною активністю ФЦ *b*₂ проводився за допомогою опрацьованого нами методу візуалізації ферментативної активності колоній пермеабілізованих клітин на чашках Петрі [Gayda *et al.*, 2003]. Найбільш інтенсивно забарвлені колонії дріжджів відбирались із матричної чашки для більш детального біохімічного дослідження. Питома активність ФЦ *b*₂ у відібраних трансформантів, вирощених у середовищі з 1%

глюкозою і 0,2% L-лактатом, відповідала 2,8 – 3,1 мкмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка, тоді як у вихідного штаму С-105 – 0,38 мкмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка. Різниця в активності ферменту становила 7,4-8,2 раза.

Конструювання штамів – продуцентів DLDH *O. polymorpha* Конструювання дріжджового надпродуцента D-лактат: цитохром *c* оксидоредуктази (DLDH) *O. polymorpha* проводилось у два етапи. Для позбавлення специфічної L-лактат: цитохром *c* оксидоредуктазної активності, було проведено делецію гена *CYB2* у батьківському штамі *O. polymorpha* С-105 (*gcr1 catX*). На наступному етапі, гомологічний ген *DLD1*, у складі плазмиди для мультикопійної інтеграції, надекспресовано в штамі *cyb2Δ* під контролем сильного конститутивного промотора гена *AOX*.

При конструюванні делеційної касети для видалення гена *O. polymorpha* *CYB2*, що кодує L-лактат: цитохром *c* оксидоредуктазу, 5'-некодуючу ділянку (~1,3 т.п.н.) гена *CYB2* ампліфікували за допомогою ПЛР, використовуючи відповідні праймери і хромосомну ДНК штаму *O. polymorpha* NCYC 495 (*leu1-1*) як матрицю. Отриманий фрагмент було фланковано сайтами рестрикції *Hind*III і *Kpn*I. За допомогою пари праймерів та плазмиди рPICZ-B (Invitrogen, Карлсбад, штат Каліфорнія, США) як матриці, ампліфіковано ген *ble*, що забезпечує резистентність до антибіотика зеоцину. Далі, фрагмент розміром ~1,2 т.п.н. клоновано як *Pst*I-фрагмент між 5'- та 3'-некодуючими ділянками гена *CYB2*. Сконструйована плазміда отримала назву рLR_суб2_Z (~ 6.2 т.п.н.). Нуклеотидну послідовність клонованого гена перевірено шляхом секвенування (Рис. 2, А).

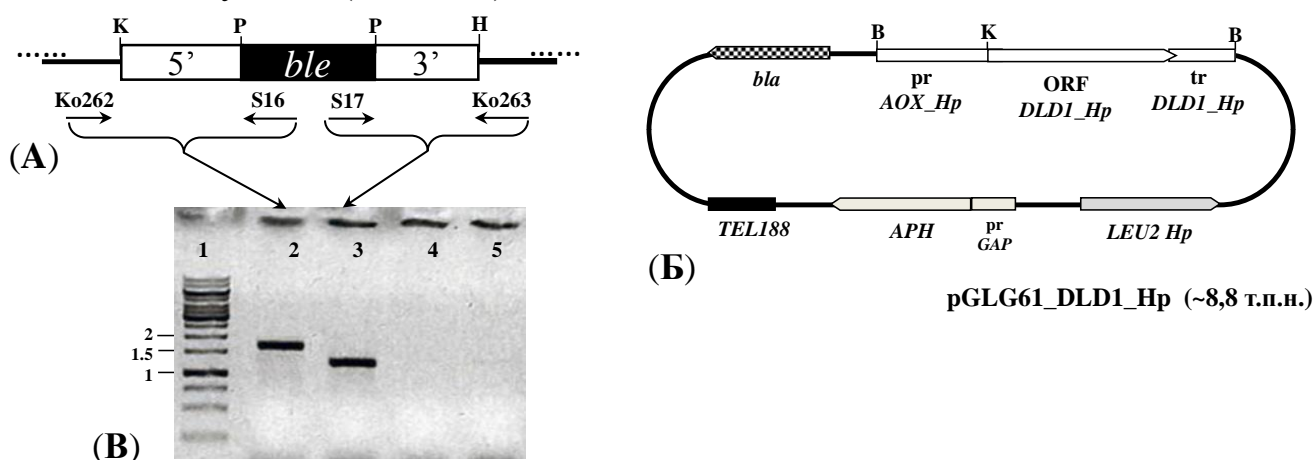


Рис. 2. (А) Схема делеційної касети *CYB2*. Ko262, S16, S17, Ko263 – праймери. (Б) Фізична карта плазмиди рGLG61_DLD1_Hp (~ 8,8 т.п.н.). Промотор алкогольоксидази (*HpAOX*) та відкрита рамка трансляції (ORF) *DLD1* з термінатором представлено білою лінією. Ген *LEU2* *O. polymorpha* – сірою лінією. Ген *bla* – заштрихованою лінією. Промотор *GAP* і ген резистентності *APH* з вкороченим промотором гена *GAP* – сірим кольором, а теломерну ділянку (*TEL188*) – чорним. Сайти рестрикції: В – *Vam*HI; К – *Kpn*I; Р – *Pst*I. (В) Електрофорема ПЛР-аналізу штамів *cyb2Δ*. Маркери молекулярної маси наведено в т.п.н. (лунка 1), лунки 2 та 3 – фрагменти ПЛР, ампліфіковані парою праймерів Ko262 / S16 та S17 / Ko263 з геномної ДНК штаму *cyb2Δ*, лунки 4 та 5 – ампліфікація за допомогою тих же пар праймерів за використання геномної ДНК вихідного штаму С-105 як контроль.

Ген *DLD1* *O. polymorpha* з термінаторною ділянкою та промотор гена алкогольоксидази ампліфікували з геномної ДНК штаму *O. polymorpha* NCYC 495 *leu1-1*, використовуючи відповідні пари праймерів. Ориманий фрагмент обробляли ендонуклеазою рестрикції *Bam*HI та клонували у *Bam*HI-лінеаризовану та дефосфорильовану плазмиду pGLG61 [Sohn *et al.*, 1999], внаслідок чого було отримано рекомбінантну плазмиду pGLG61_DLD1_Hp (Рис. 2, Б).

Рекомбінантна плазміда pGLG61_DLD1_Hp, отримана з pGLG61 (Рис. 2, Б), була введена у штам-реципієнт *O. polymorpha* C-105 (*cyb2Δ gcr1 catX*). Отримані трансформанти вирощували на середовищі YPS у присутності підвищених концентрацій G418. Найвища концентрація G418, яка дозволила трансформантам рости, становила 1 мг·мл⁻¹. Трансформанти стабілізували культивуванням в неселективних середовищах протягом 12-14 поколінь, з подальшим перенесенням на селективне середовище з G418. Наявність експресійної касети в стабільних трансформантах підтверджували за допомогою ПЛР.

Сконструйовані рекомбінантні штами *O. polymorpha*, що експресують *DLD1*, і вихідні штами *cyb2Δ* та C-105, аналізували біохімічно. Активність ФЦ *b₂* у штаммах *cyb2Δ* та *cyb2Δ/DLD1* не виявлялась, що зумовлено делецією гена *CYB2*. Питома активність DLDH у штамі *cyb2Δ/DLD1* була у 6 разів вищою порівняно з вихідними штаммами *cyb2Δ* та C-105, і становила 1,82 Од·мг⁻¹.

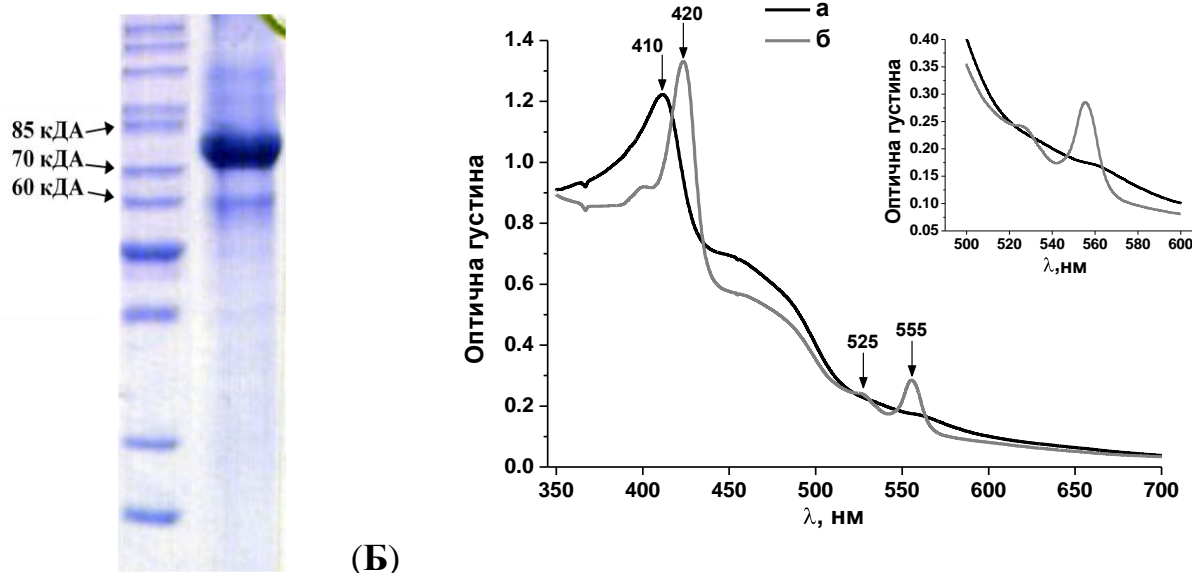
Оптимізація виділення та очищення L- та D-лактат:ферицитохром с-оксидоредуктаз із клітин рекомбінантних штамів дріжджів *O. polymorpha*

Оптимізація виділення та очищення флавоцитохрому *b₂* з клітин рекомбінантного штаму *O. polymorpha* «tr1» (*gcr1 catX CYB2*). Природнім акцептором електронів ФЦ *b₂* є цитохром *c*, що свідчить про селективне зв'язування цих білків. Для афінної очистки ФЦ *b₂* нами синтезовано афінний сорбент на основі амінопропілсилохрому, модифікованого комерційним цитохромом *c* в ролі ліганда. Цитохром *c* із серця бика ковалентно зв'язували з силохромом, активованим глутаровим альдегідом, завдяки утворенню основи Шиффа між залишками лізину цитохрому *c* та альдегідними групами активованого силохрому.

Вихідний носій амінопропілсилохром синтезували за схемою, описаною Стасюк [Стасюк *та ін.*, 2011]. Модифікацію активованого сорбенту проводили за допомогою цитохрому *c*. Для контролю ступеня модифікації носія, визначали білок цитохрому *c* до і після його зв'язування з носієм. В результаті отримано афінний сорбент що містив 1,9 мг·мл⁻¹ цитохрому *c*.

Для проведення очистки ФЦ *b₂*, 15 мл безклітинних екстрактів (БЕ) із сумарною активністю ФЦ *b₂* 278 Од. і кількістю білка 359 мг наносили на колонку, наповнену афінним сорбентом. Після нанесення БЕ, колонку промивали 25 мМ фосфатним буфером рН 7,8 та елюювали зв'язані білки зростаючими концентраціями того ж буферу. Отримані білкові фракції збирали та аналізували в них активність фермента. Внаслідок афінної хроматографії, отримано очищений препарат ФЦ *b₂* з питомою активністю 10 Од·мг⁻¹. Вихід фермента за активністю становив 74%. Для стабілізації фермента, до об'єднаних фракцій елюату додавали сухий амоній сульфат до 70% від насичення при 0 °С, підтримуючи рН близько 7,5.

Ступінь очистки цільового фермента від баластних білків характеризували, визначаючи його активність та концентрацію білка в кожній фракції елюату, та за допомогою електрофорезу в ПААГ за денатуруючих умов у присутності SDS (Рис. 3, А).



(А) Електрофоретична характеристика очищеного препарату ФЦ b_2 *O. polymorpha*, отриманого за допомогою афінної хроматографії. SDS-електрофорез за денатуруючих умов у 12% ПААГ. Білки забарвлені Кумассі R-250. (Б) Спектри поглинання ФЦ b_2 вихідної окисленої (а) та відновленої форми (у присутності 0,3 мМ L- лактату) (б).

Як видно з електрофореграми, очищений препарат фермента представлений чіткою домінуючою зоною з молекулярною масою субодиниць 74 кДа. Мінорна зона з молекулярною масою 60,6 кДа відповідає домішковому білку невідомої природи, можливо, частково деградованому ФЦ b_2 . Для додаткової характеристики чистоти очищеного препарату ФЦ b_2 , аналізували спектри поглинання окисленої та відновленої форм фермента у видимій області (Рис. 3, Б). Як видно із спектру поглинання окисленої форми ФЦ b_2 , пік Соре (максимум поглинання гему) припадає на 410 нм з коефіцієнтом мілімолярної екстинції близько $20,0 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ (із врахуванням молекулярної маси субодиниці 74 кДа). У випадку відновленої форми фермента, максимум поглинання гемової групи дещо зміщується до 420 нм з коефіцієнтом мілімолярної екстинції $21,9 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, а піки в області 525 та 555 нм є близькими до максимумів поглинання флавінових груп, описаних у літературі для флавоцитохромів b_2 [Jacq *et al.*, 1972]. Окрім того, чіткий пік Соре свідчить про високу чистоту препарату ФЦ b_2 .

Розробка схеми виділення мембранного ферменту DLDH із клітин *O. polymorpha* «tr6» (*gcr1 catX cyb2Δ/DLD1*) та його очищення. За основу схеми виділення DLDH *O. polymorpha* послужив метод, описаний для дріжджів *S. cerevisiae* [Gregolin & Singer, 1963; Pohanka *et al.*, 2008].

Клітини дріжджів трансформанта «tr6» *O. polymorpha* вирощували в середовищі «Беркгольдера» з додаванням, як джерела Карбону, 1% глюкози та 0,5 % рацемату лактату, в колбах при 37°C на шейкері протягом 62 год.

На початку стаціонарної фази росту, клітини осаджували центрифугуванням та двічі відмивали дистильованою водою та 50 мМ ФБ, рН 7,8, від компонентів середовища. Відмиті клітини висушували та проводили їх фізичне руйнування на кульовому млинку скляними кульками Балотіні. Руйнування відбувалося в ФБ, рН 7,8 із 1 мМ фенілметансульфонілфториду без додання ЕДТА, оскільки раніше нами було виявлено негативний вплив хелатора ЕДТА на активність DLDH. За такої схеми фізичного руйнування отриманий БЕ мав активність DLDH 2,0 Од·мл⁻¹. З метою підвищення виходу мембранозв'язаного фермента DLDH із уламків клітин, було використано додаткову обробку уламків клітин детергентом Тритон Х-100, дитіотреїтолом та нонілфеноксиполіетоксилетанолом (NP40). Проте, ефективність руйнування клітин не підвищилась, а стабільність DLDH помітно знизилась. Тому для подальших досліджень було вибрано варіант отримання БЕ лише за допомогою фізичного руйнування кульками Балотіні.

Після отримання БЕ, білки фракціонували осадженням охолодженим 50% ацетоном та збирали центрифугуванням. Суспензію отриманого осаду наносили на колонку (1,0 x 20 см), заповнену сорбентом DEAE-Toyopearl 650M (TSK-GEL, Японія). Елюцію проводили 15 % (від насичення при 0 °С) амоній сульфатом в буфері 50 мМ ФБ, рН 7,8. При елюції фермента спостерігалось його вимивання із верхнього шару сорбенту у вигляді більш забарвленої зони. Висолювання ферменту проводили додаванням до елюату сухого амоній сульфату до 70% (від насичення при 0 °С), контролюючи рН близько 7,5. Ступінь очистки цільового фермента від баластних білків характеризували, визначаючи його активність і концентрацію білка в кожній фракції елюату, та за допомогою електрофорезу в ПААГ за денатуруючих умов у присутності SDS (Рис. 4).

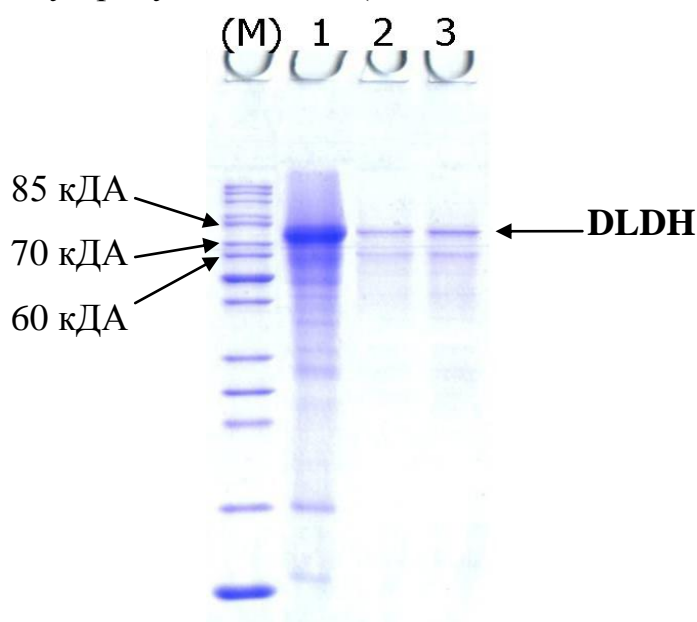


Рис. 4. Електрофоретична характеристика сконцентрованого безклітинного екстракту до нанесення на колонку (1) та очищеного препарату DLDH *O. polymorpha* «tr6» (2, 3). SDS-електрофорез за денатуруючих умов (12% SDS-ПААГ), білки забарвлені Кумасі R-250. (М) - маркери молекулярної маси.

Вихід за активністю ферменту після стадії хроматографічної очистки становив приблизно 50 %. Найвища питома активність в окремих фракціях зі ступенем очистки 7 разів досягала 1,1 Од·мг⁻¹. Для стабілізації фермента, до об'єднаних фракцій елюату додавали сухий амоній сульфат до 70% (насичення) при 0 °С, підтримуючи рН близько 7,5.

Створення лабораторних прототипів біореакторів для конверсії рацемату молочної кислоти до оптично чистого L-ізомера та токсичного D-лактату

Отримання D-лактату з рацемату шляхом специфічного окислення L-лактату. Отримання чистих стереоізомерних форм – важливе завдання багатьох біотехнологічних досліджень. Нами запропоновано новий ензиматичний підхід отримання чистого стереоізомеру D- або L-лактату із рацемату молочної кислоти шляхом ензиматичної конверсії одного із стереоізомерів специфічними L- або D-лактат:ферицитохром *c*-оксидоредуктазами.

Для отримання D-стереоізомеру із рацемату молочної кислоти, використано систему, яка містила очищений фермент флавоцитохром b_2 (ФЦ b_2), специфічним субстратом якого є L-лактат. Максимальне окислення L-лактату було досягнуто при використанні фермента з активністю $1,0 \text{ Од} \cdot \text{мл}^{-1}$ у суміші з 10 мМ L,D-рацематом молочної кислоти при рН 7,0 і температурі $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (Рис. 5).

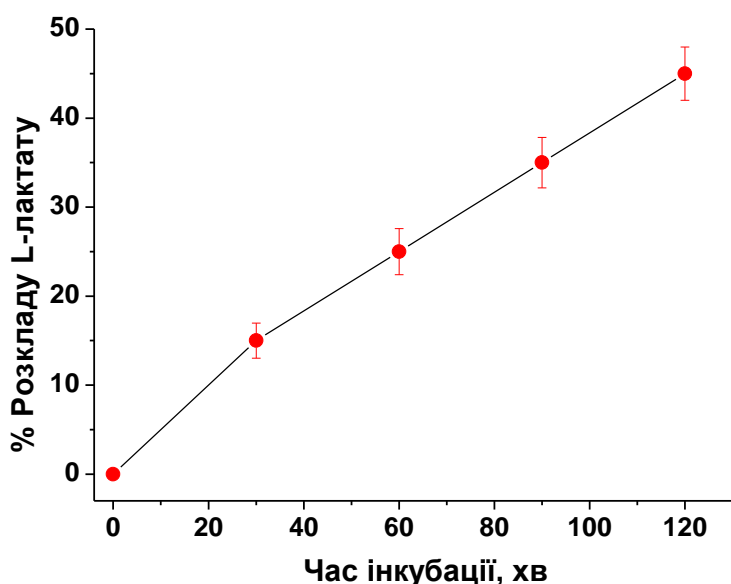


Рис. 5. Кінетика розщеплення лактату в модельній суміші 10 мМ рацемату лактату за допомогою очищеного препарату ФЦ b_2 .
Умови: 10 мМ МОПС-буфер, рН 7,0, 10 мМ ФМС, вихідна концентрація D,L-лактату - 10 мМ , $1,0 \text{ Од} \cdot \text{мл}^{-1}$ ферменту при температурі $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Ефективність розщеплення 10 мМ лактату в процесі 2-годинної інкубації складала 37 % - 43 % із середньою продуктивністю приблизно $0,2 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{год}^{-1}$.

Запропонований підхід може бути використано як основу для біотехнологічного отримання оптично чистого D-енантіомеру із хімічно синтезованого рацемату D,L-лактату.

Створення лабораторного прототипу біореактора для усунення D-лактату.

Для створення біореактора на основі клітин, здатних до детоксикації D-лактату, використано пермеабілізовані ліофілізовані клітини штаму *O. polymorpha* «tr6» (*gcr1 catX cyb2A/DLD1*). Питома активність DLDH цих клітин становила $1,33 \text{ Од} \cdot \text{мг}^{-1}$. Для конструювання біореактора, пермеабілізовані дріжджові клітини іммобілізували в кальцій-альгінатному гелі, формуючи біофункціоналізовані альгінатні кульки, які поміщали на колонку $1 \times 10 \text{ см}$ (4 мл гелю). Для контролю, було використано кульки альгінатного гелю без клітин.

Як модельну суміш, використовували 20 мМ D-лактат в 50 мМ ФБ, рН 7,8 і 1 мМ CaCl₂. Ця суміш протікала через колонки з різною швидкістю – 50 мл·хв⁻¹ і 10 мл·хв⁻¹. Залишковий D-лактат в протоці визначали хімічним методом Бюхнера [Buchner & Schottenhammer, 1920] (Рис. 6).

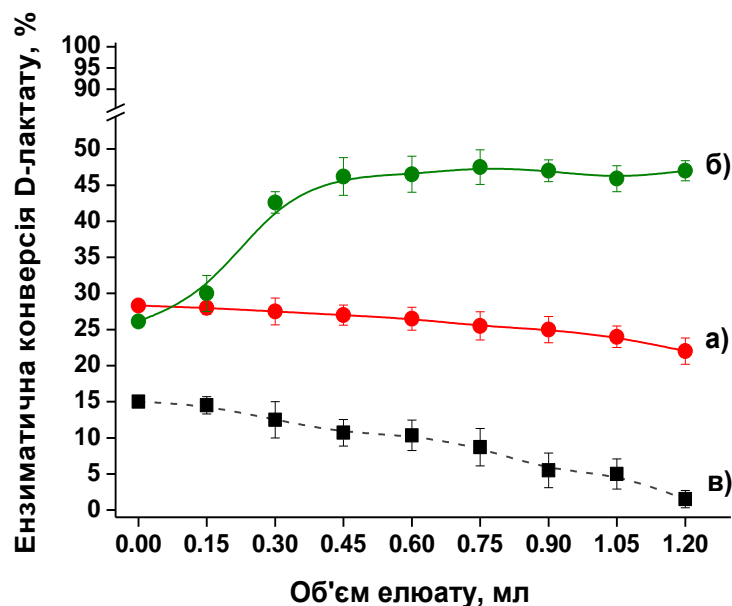


Рис. 6. Залежність ензиматичної конверсії від швидкості потоку D-лактату біореактором на основі пермеабілізованих клітини *O. polymorpha* «tr6».

(а) швидкість потоку 50 мкл·хв⁻¹; (б) швидкість потоку 10 мкл·хв⁻¹; (в) контроль (без клітин); швидкість потоку 10 мкл·хв⁻¹. Умови: ензиматична активність DLDH пермеабілізованих клітин – 80 Од·мл⁻¹, концентрація клітин – 60 мг·мл⁻¹.

Ефективність розкладу D-лактату біореактором суттєво залежить від швидкості потоку через колонку. За швидкості потоку 10 мкл·хв⁻¹ ефективність конверсії D-лактату складала 45 – 53 %. (Рис. 6).

Після етапу оптимізації і удосконалення, розроблений прототип біореактора може бути апробований в пілотному режимі для усунення D-лактату в ферментованих харчових продуктах.

Приготування та характеристика наночастинок золота та їх біофункціоналізація для використання в сенсорних технологіях. Золоті наночастинок (Au-НЧ) готували методом відновлення іонів Au³⁺ з розчину Гідрогентетрахлораурату(III). Відновлюючим агентом слугував NaBH₄. Вихід золотих наночастинок при цьому складав близько 80 % (розрахунок вели за використання гравіметричного методу). Спектрофотометричну характеристику отриманих наночастинок проводили в діапазоні хвиль 250-800 нм. Синтезовані золоті наночастинок характеризуються чітким піком абсорбції при 525 нм (Рис. 7, А) внаслідок поверхневого плазмонного резонансу, що є типовим для наночастинок золота [Bohren *et al.*, 1983]. Окрім того, дифракційні параметри Au-НЧ дають змогу оцінити їх розмір, що знаходиться у діапазоні 15-30 нм [Stasyuk *et al.*, 2011].

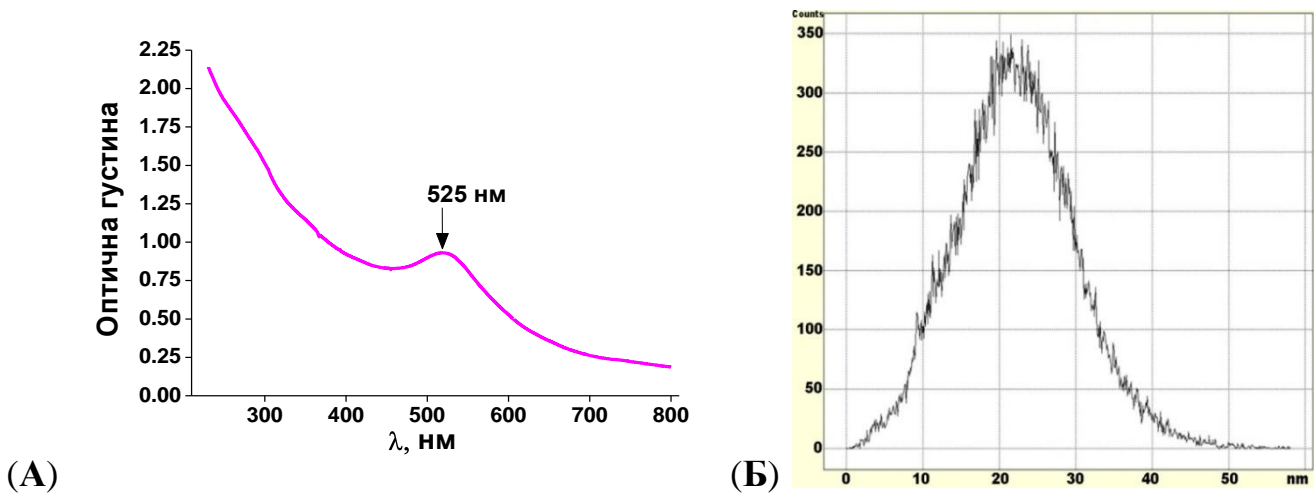


Рис. 7. (А) Спектр світлопоглинання отриманих золотих наночастинок. (Б) Гістограма розподілу наночастинок за розміром, отримана за використання атомно-силової мікроскопії. На осі абсцис показано поперечний розмір частинок (нм), а на осі ординат – число сканованих частинок.

Для вивчення можливості використання Au-НЧ, як носіїв ферментів, проведено більш детальне фізико-хімічне та структурне дослідження їх характеристик за використання сканувальної електронної мікроскопії (SEM), рентгеноспектрального аналізу (РСМ), атомно-силової мікроскопії (АСМ) та трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ). Результати SEM-аналізу показують, що середній діаметр Au-НЧ є меншим за 50 нм, а дані РСМ підтверджують утворення частинок Au^0 з типовим піком $K\alpha$ при 2,1 кеВ. Дані АСМ-досліджень свідчать про утворення Au-НЧ з середнім розміром наночастинок в діапазоні від 20 до 25 нм (Рис. 7, Б). Мікрофотографії ТЕМ показують, що Au-НЧ у переважній більшості є однорідними частинками правильної кулястої форми з гомогенною поверхнею.

Для функціоналізації синтезованих наночастинок, їх осаджували центрифугуванням та обробляли 10 мМ водним розчином цистеаміну протягом ночі при + 4 °С. Після цього наночастинок відмивали тричі та ресуспендували у 100 мкл 5 мМ ФБ, рН 7,5. Біофункціоналізація модифікованих цистаміном Au-НЧ проводилась шляхом додавання очищеного ФЦ b_2 з питомою активністю 22 Од·мл⁻¹ у співвідношенні 2:1. Суміш інкубували при +4 °С протягом ночі. Вихід біофункціоналізованих НЧ (ФЦ b_2 -Au-НЧ) становив 15 %, що відповідало 3,3 Од·мл⁻¹ фермента.

Отримані ФЦ b_2 -Au-НЧ у подальшому було використано для додаткового збагачення клітин *O. polymorpha* «tr1» ФЦ b_2 при конструюванні мікробного біосенсора на L-лактат.

Конструювання біосенсорів на L-лактат за використання біофункціоналізованих наночастинок золота (Au-НЧ)

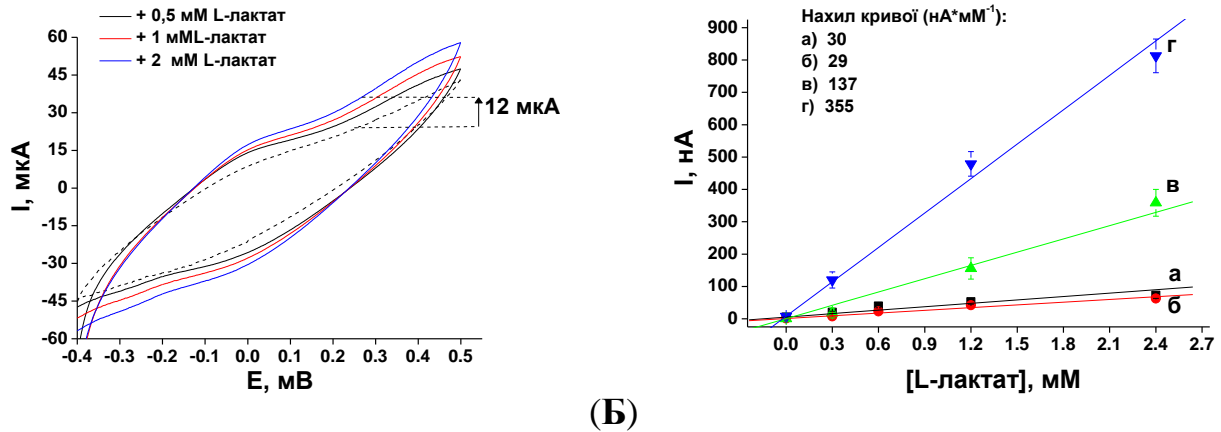
Конструювання мікробних біосенсорів на L-лактат за використання рекомбінантних клітин *O. polymorpha* «tr1» (*gcr1 catX CYB2*) і біофункціоналізованих Au-НЧ. Ідею введення в клітини екзогенного ферменту,

зв'язаного із Au-НЧ, для збільшення в них вмісту цільового ферменту при конструюванні біоелементів мікробних сенсорів нами запропоновано вперше. Збагачення дріжджових клітин ФЦ b_2 досягається комбінацією двох підходів: 1) на генетичному рівні - шляхом надекспресії відповідного гена *HpCYB2* у рекомбінантних клітинах *O. polymorpha* «tr1»; 2) за використання нанотехнологічного підходу - шляхом введення в клітини ФЦ b_2 , іммобілізованого на золотих наночастинках (ФЦ b_2 -Au-НЧ).

Для збагачення рекомбінантних дріжджових клітин ФЦ b_2 -Au-НЧ використовували штам *O. polymorpha* «tr1» (*gcr1 catX / prAOX_CYB2*), що надекспресує ФЦ b_2 , з рівнем питомої активності до $1,2 \text{ Од} \cdot \text{мг}^{-1}$ білку в безклітинних екстрактах або $4,45 \text{ Од} \cdot \text{мг}^{-1}$ для пермеабілізованих клітин. Для непермеабілізованих клітин, їх збагачення ФЦ b_2 -Au-НЧ (з вихідною активністю ФЦ b_2 $3,3 \text{ Од} \cdot \text{мл}^{-1}$) приводить до 1,6-кратного підвищення ферментативної активності. Для пермеабілізованих клітин, збагачення ФЦ b_2 -Au-НЧ призводить до 2,3-кратного збільшення ферментативної активності. Таким чином, питома активність ФЦ b_2 клітин за рахунок збагачення додатково зростає на 49 %. Це можна пояснити кращою проникністю пермеабілізованих клітин для ФЦ b_2 -Au-НЧ порівняно з інтактними клітинами. Морфологічна характеристика пермеабілізованих дріжджових клітин на різних етапах збагачення ФЦ b_2 -Au-НЧ проводилась за допомогою ТЕМ, а проникнення ФЦ b_2 -Au-НЧ всередину дріжджових клітин було підтверджено за використання РСМ. Рентгенівська спектрограма показує присутність Au^0 всередині пермеабілізованих клітин (пік *K α* при 2,1 кеВ, характерний для Au^0), що підтверджує проникнення ФЦ b_2 -Au-НЧ у дріжджові клітини. Отримані збагачені клітини *O. polymorpha* «tr1» використано для конструювання мікробного біосенсора для аналізу L-лактату.

При конструюванні L-лактат-селективного клітинного біосенсора, в ролі вільнодифундуючого редокс-медіатора використовували 2 мМ феназинметосульфат (ФМС), який забезпечує перенесення електронів між графітовим робочим електродом і ФЦ b_2 – як продукту експресії гена *CYB2*, так і за рахунок ФЦ b_2 зв'язаного Au-НЧ. ФМС здатен легко проникати всередину пермеабілізованих клітин і, після забирання електрону з відновленого ферменту, автоокислюватись на поверхні графітового робочого електроду.

Ефективність перенесення електронів з відновленого ФЦ b_2 (всередині клітин) на поверхню робочого електроду за посередництва ФМС для ФЦ b_2 -Au-НЧ–збагачених та незбагачених (контроль) пермеабілізованих дріжджових клітин характеризували за допомогою циклічної вольтамперометрії. Цей метод також дає інформацію про оптимальний робочий потенціал окислення ФМС на графітових робочих електродах (Рис. 8, А), а хроноамперометричний аналіз дає змогу оцінити основні операційні параметри біоелектродів – чутливість, межі лінійності та ліміт визначення (Рис. 8, Б).



(А) Циклічні вольтамперограми мікробних L-лактат-селективних біоелектродів, сконструйованих на основі 3,05 мм графітових електродів, модифікованих ФЦ b_2 -Au-Ni збагаченими пермеабілізованими клітинами *O. polymorpha* «tr1» при внесенні зростаючих концентрацій L-лактату. Умови: межі сканування - від 0,4 до 0,6 мВ проти електроду порівняння Ag/AgCl; швидкість сканування $7 \text{ мВ} \cdot \text{с}^{-1}$ у 50 мМ фосфатному буфері, рН 7,8. (Б) Калібрувальні криві відгуку біоелектродів на L-лактат у лінійній області. Позначення: а) інтактні клітини дріжджів; б) Au-Ni-модифіковані клітини дріжджів; в) пермеабілізовані клітини дріжджів; г) ФЦ b_2 -Au-Ni-збагачені пермеабілізовані клітини.

Для біоелектроду, що базується на використанні пермеабілізованих клітин, збагачених ФЦ b_2 -Au-Ni, у порівнянні з контрольним біоелектродом (пермеабілізовані клітини дріжджів) спостерігається вдвічі вища величина відгуку (сила струму) на внесення L-лактату. Сигнал для 3,5 мМ L-лактату складає 12 мкА для ФЦ b_2 -Au-Ni-збагачених клітин і 6 мкА – для контрольних біоелектродів. Як оптимальний робочий потенціал біосенсорної системи вибрано потенціал +250 мВ проти електроду порівняння Ag/AgCl.

Хроноамперометричну характеристику біоелектродів на основі різних типів біорозпізнавальних клітинних елементів представлено на рисунку 8 (Б). Найвища чутливість досягається для біоелектродів на основі ФЦ b_2 -Au-Ni-збагачених пермеабілізованих клітин ($48,6 \text{ А} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{м}^{-2}$), що більш ніж у два рази перевищує чутливість електродів з незбагаченими пермеабілізованими клітинами ($18,7 \text{ А} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{м}^{-2}$). Контрольні біоелектроди на основі інтактних немодифікованих клітин дріжджів виявляють значно нижчу чутливість ($4,1 \text{ А} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{м}^{-2}$). Досить близьке значення чутливості було отримано і для інших біоелектродів, сконструйованих з використанням Au-Ni-модифікованих непермеабілізованих клітин дріжджів ($3,9 \text{ А} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{м}^{-2}$). Низька чутливість для обох типів біоелектродів на основі непермеабілізованих клітин дріжджів пояснюється обмеженою дифузією субстрата і медіатора через інтактну клітинну стінку.

Висока чутливість сконструйованого L-лактатного біосенсора на основі ФЦ b_2 -Au-Ni-збагачених пермеабілізованих клітин *O. polymorpha* «tr1» переконливо свідчить, що для створення мікробних біосенсорів із поліпшеними біоаналітичними

характеристиками можна використовувати запропонований нами підхід збагачення клітин цільовим ферментом, іммобілізованим на наночасинці.

Створення L-лактат-селективного біосенсора “третього покоління” на основі ФЦ b_2 , іммобілізованого на поверхні золотого електроду, модифікованого Au-НЧ. Для створення безмедіаторного ензимного біосенсора нами використано здатність відновленого ФЦ b_2 до прямого перенесення електронів на поверхню робочого електроду [Smutok *et al.*, 2005]. Цей процес можливий лише з молекул моношару ферменту, що безпосередньо контактують із поверхнею електроду, за умови водночас правильної орієнтації групи гему в достатній для перенесення електронів віддалі до електроду. Оскільки ФЦ b_2 – достатньо складна тетрамерна молекула, що містить сумарно 8 доменів, ефективність прямого перенесення електронів є досить низькою при класичній іммобілізації фермента на поверхні електроду [Smutok *et al.*, 2005] (Рис. 9, А).

При конструюванні L-лактат-селективного біосенсора “третього покоління” на основі ФЦ b_2 , наночасинку золота формували на поверхні комерційного 4 мм золотого електроду C220 («DropSens», Ріверв’ю, Флорида, США) шляхом відновлення іонів золота(III) з $\text{H[AuCl}_4]$ 30% перексидом водню [Panda *et al.*, 2007].

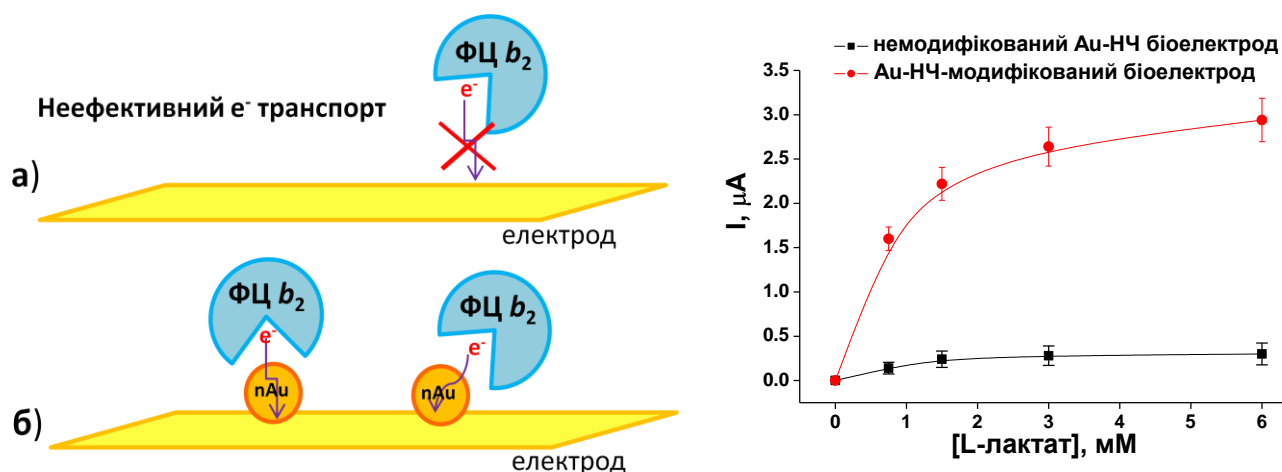


Рис. 9. (А) Схематичне зображення прямого перенесення електронів із відновленого ФЦ b_2 на поверхню золотого (а) та Au-НЧ-модифікованого золотого (б) планарних електродів. (Б) Калібрувальні криві відгуку на L-лактат. Умови: робочий потенціал 250 мВ проти Ag/AgCl у 50 мМ ФБ, рН 7,5.

Модифікація золотих планарних електродів наночасинкою золота, за рахунок збільшення робочої поверхні, значним чином підвищує електропровідність робочого електроду (у 18 разів). Для підтвердження утворення наночасинки золота було проведено дослідження поверхні Au-НЧ-модифікованих золотих електродів за допомогою СЕМ та РСМ. На мікрофотографіях СЕМ спостерігаються чіткі відмінності у структурі поверхні немодифікованого та модифікованого наночасинкою золота електродів. Внаслідок формування Au-НЧ-шару, поверхня електроду стає мікрористалічною з наявністю як кластерів неправильної форми, так і пучків мікрофібрилярних структур. Рентгеноспектральний аналіз також підтверджує формування наночасинки золота на поверхні золотого електроду.

Досліджено фізико-хімічні характеристики розроблених амперометричних біоелектродів “третього покоління”, селективних до L-лактату. Для порівняння, максимальна величина відгуку ФЦ b_2 -модифікованих традиційних електродів (без наночару Au) становить $0,39 \pm 0,027$ мкА, тоді як електрод, модифікований Au-НЧ та ФЦ b_2 демонструє на порядок вищу величину відгуку ($3,34 \pm 0,03$ мкА) (площа поверхні електроду $12,6 \text{ мм}^2$) (Рис. 9, Б). Значення позірної величини константи Міхаеліса-Ментен (K_M) біосенсора, визначена на основі концентраційних залежностей відгуку на L-лактат, становить від $0,94 \pm 0,243$ мМ (для фізично адсорбованого ФЦ b_2 на поверхні золотого планарного електроду) та $0,79 \pm 0,03$ мМ для електроду, модифікованого наночаром золота та ФЦ b_2 . Модифікований Au-НЧ та ФЦ b_2 біоелектрод демонструє чутливість $106 \text{ А} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{М}^{-2}$, що на порядок перевищує чутливість немодифікованого наночаром золота біоелектроду ($11,0 \text{ А} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{М}^{-2}$). Значення порогової межі детекції та порогової межі кількісного визначення для модифікованого золотом біоелектроду, обраховані за допомогою хроноамперометрії, складають $0,1$ і $0,33$ мМ L-лактату, відповідно. Селективність скоструйованих біоелектродів є дуже високою, подібно як для описаних нами раніше біосенсорів [Smutok *et al.*, 2005], а стабільність при зберіганні складає більше 34 днів при $+4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Розроблені біосенсори «третього покоління» використані для визначення вмісту L-лактату в фармацевтичних препаратах трансфузійного призначення. Результати біосенсорного та ензиматичного методів аналізу за використання NAD^+ -залежної L-лактатдегідрогенази (як референтного), добре корелюють із величинами, зазначеними виробником: різниця варіює від $1,2$ до $3,1$ % (для L-лактат-вмісних препаратів та $7,5$ % рацемату лактату). Крім того, розроблені біосенсори «третього покоління» використані нами для створення прототипу неінвазивного біосенсора для прямого аналізу L-лактату в слині та поті людини. Отримані результати визначення вмісту L-лактату у слині – $0,32$ – $0,36$ мМ і $4,85$ – $5,2$ мМ L-лактату в поті людини у стані спокою добре корелюють із результатами, отриманими референтними методами, та узгоджуються з літературними даними [Schabmueller *et al.*, 2006; Bijman *et al.*, 1987].

Розробка та оптимізація амперометричних мікробних біосенсорів для визначення D-лактату з використанням клітинних уламків, субклітинних фракцій, збагачених мітохондріями, та клітин *O. polymorpha* «tr6» (*gcr1 catX cyb2Δ/DLD1*)

Конструювання мікробних біосенсорів на D-лактат на основі клітинних уламків *O. polymorpha* «tr6» і електроосаджуваних полімерів. Проведено дослідження по конструюванню D-лактат-селективного біосенсора на основі клітинних уламків *O. polymorpha* «tr6». Перевагами такого сенсора є швидке приготування біоелемента, його дешевизна, пов'язана з відсутністю стадії очистки фермента, та можливість його стабілізації за рахунок збереження природного оточення фермента. Оскільки D-лактат: цитохром *c* - оксидоредуктаза (DLDH) – це мембрано-зв'язаний фермент, його концентрація в уламках рекомбінантних клітин є вищою у порівнянні з безклітинними екстрактами. Висока селективність до D-лактату біоелемента на основі уламків клітин із рекомбінантного

надпродуцентного штаму *O. polymorpha* «tr6» (*cyb2Δ pAOX-DLD1*) зумовлена делецією гена *CYB2* і, відповідно, відсутністю активності флавоцитохрому b_2 (ФЦ b_2), селективного до L-енантіомера лактату. Архітектура сенсора включає одночасне співосадження клітинних уламків штаму *O. polymorpha* «tr6», екзогенного цитохрому c та осміївмісного катодного полімера *CP-Os*. Електроосаджуваний осмії-ди(біпіридил)хлор-вмісний *CP-Os* був синтезований в лабораторії електроаналітики та біосенсорики Рурського університету (м. Бохум, ФРН). *CP-Os* поєднує дві функції: як медіатор перенесення електронів та як носій компонентів біоселективного елемента на поверхні робочого електроду (Рис. 10, А). Аналіз калібрувальних кривих, отриманих для біоелектродів із біензимною архітектурою (з використанням цитохрому c), а також без цього природного акцептору електронів представлено на Рис. 10, Б.

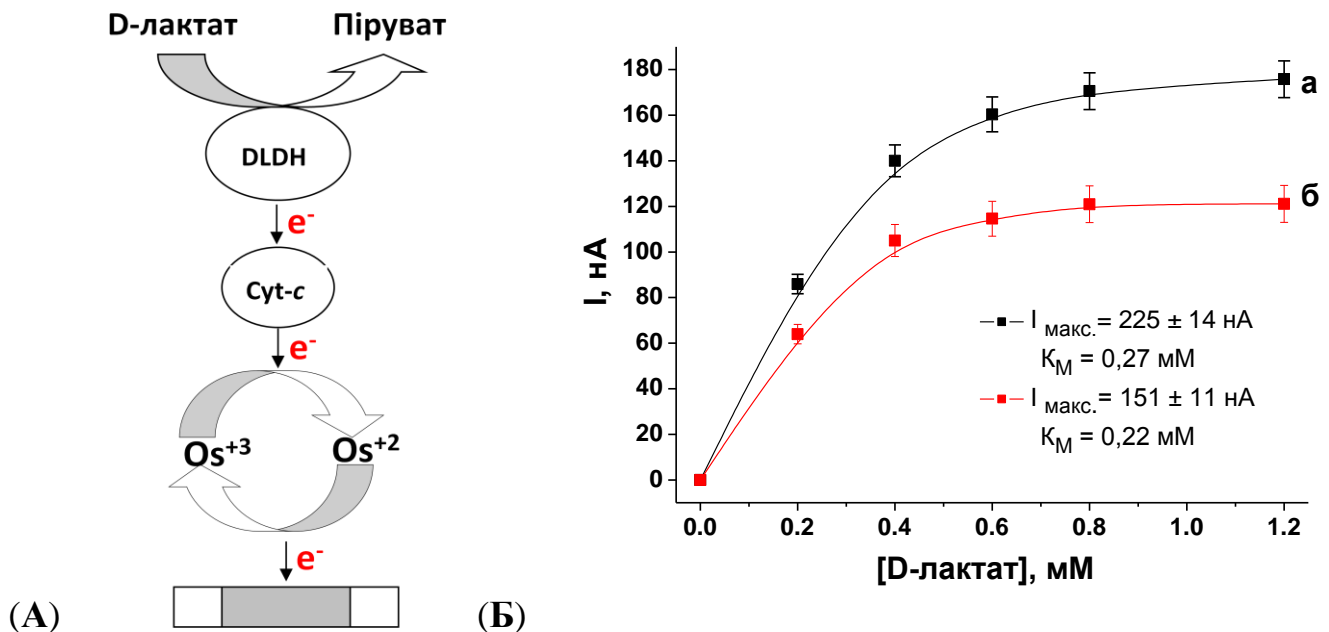


Рис. 10. (А) Принципова схема біензимного D-лактат-селективного біосенсора. Позначення: DLDH – D-лактат: цитохром c - оксидоредуктаза, Cyt c – цитохром c . (Б) Калібрувальні криві відгуку на D-лактат, отримані з використанням біоелектродів із біензимною архітектурою (а) та біоелектродів без внесення екзогенного цитохрому c (б). Умови: робочий потенціал 250 мВ проти Ag/AgCl у 50 мМ ФБ, рН 7,8.

Обидва варіанти сенсорних архітектур охарактеризовано за максимальним струмом при насиченні субстратом ($I_{\text{макс.}}$) та значенням позірної величини константи Міхаеліса-Ментен (K_M). Для біензимного електроду $I_{\text{макс.}}$ становить $225 \pm 14 \text{ nA}$, тоді як біоелектрод без внесення екзогенного цитохрому c виявляє значення $I_{\text{макс.}}$ на рівні $150 \pm 11 \text{ nA}$ (Рис. 10, Б). Значення K_M для D-лактату, розраховане із відповідних калібрувальних кривих для біензимного біоелектроду, є дещо вищим, ніж для моноензимного електроду ($0,27 \text{ mM}$ у порівнянні з $0,22 \text{ mM}$, відповідно). Чутливість до D-лактату складає $61,6 \text{ A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ для біензимного біоелектроду і $46,3 \text{ A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ для моноензимного аналога. Порогова межа детекції для обох архітектур

біоелектродів є близькою 2,6 мкМ D-лактату. Розроблений прототип біензимного біосенсора демонструє високу селективність до D-лактату і не виявляє жодного побічного відгуку на етанол, глюкозу, піруват, L-лактат, які вносились у надлишкових кількостях (0,3 – 0,6 мМ). Водночас, величина відгуку на D-енантіомер лактату, на фоні послідовного внесення потенційних інтерферуючих агентів, є близькою до рівня сигналу на “чистий” D-лактат і складає 100 нА для 0,3 мМ цього аналіту. Дослідження стабільності при зберіганні обох типів D-лактатних біоелектродів свідчить, що їх можна використовувати більше 10 днів із зберіганням у буфері при +4 °С в перерві між експериментами. Значно краща стабільність (на 20%) біензимних біоелектродів пояснюється, можливо, додатковим стабілізуючим впливом цитохрому *c* на DLDH. Крім того, відносно висока стабільність біоелектродів на основі клітинних уламків *O. polymorpha* «tr6», можливо, зумовлене видаленням низькомолекулярних протеїназ при руйнуванні клітин і наступних етапах їх промивання.

Основні характеристики створеного біосенсора порівнювали з сенсором на основі ферменту DIDH з пекарських дріжджів, іммобілізованого у графітовій пасті [Pohanka *et al.*, 2008]. Біосенсиори на основі клітинних уламків *O. polymorpha* «tr6» є більш чутливими (170-230 разів), ніж біосенсор на основі DIDH з пекарських дріжджів: їх чутливість складає 46,3-61,6 А·М⁻¹·м⁻² у порівнянні до 0,27 А·М⁻¹·м⁻² (1,91 нА·М⁻¹). Розроблені біосенсиори характеризуються також нижчою межею виявлення D-лактату (2,6 мкМ) у порівнянні з 56 мкМ для DIDH-модифікованого пастоподібного електроду [Pohanka *et al.*, 2008].

Конструювання мікробних біосенсорів на D-лактат на основі субклітинних фракцій *O. polymorpha* «tr6», збагачених мітохондріями, і вільно проникаючих медіаторів електронного перенесення.

Субклітинні фракції клітин *O. polymorpha* «tr6» отримували за модифікованою методикою Грегга [Gregg *et al.*, 2009]. Перед використанням субклітинні фракції, збагачені мітохондріями, розморожували при 4 °С. Як медіатор перенесення електронів використовували 0,2 мМ ФМС за оптимального для його окислення робочого потенціалу +150 мВ проти Ag/AgCl. Субклітинні фракції на поверхні 4 мм планарного золотого електроду іммобілізували за допомогою комерційного катодного полімера GY 83-0270 005 (Рис. 11).

Відгук сенсора на основі субклітинних фракцій, збагачених мітохондріями, становить 184 нА, а позірна величина константи K_M для D-лактату – 0,17 мМ. Чутливість D-лактат-селективного біоелектроду (робоча площа 12,6 мм²) становить 14,7 А·М⁻¹·м⁻², а верхня межа лінійного діапазону відповідає 0,21 мМ D-лактату. Стабільність створеного D-лактат-селективного біосенсора характеризували за відгуком біоелектродів на 0,2 мМ D-лактат в процесі їх зберігання. Стабільність біоелектродів характеризували як залишковий відгук сенсора (%) відносно початкового сигналу (у перший день вимірювання). Показано, що час «півжиття сенсора» (50 % величини початкового сигналу) припадає на 6-ту добу його зберігання при +4 °С. Таким чином, біосенсор може використовуватись для визначення D-лактату протягом 6-ти днів, при умові recalібрації стандартним розчином D-лактату.

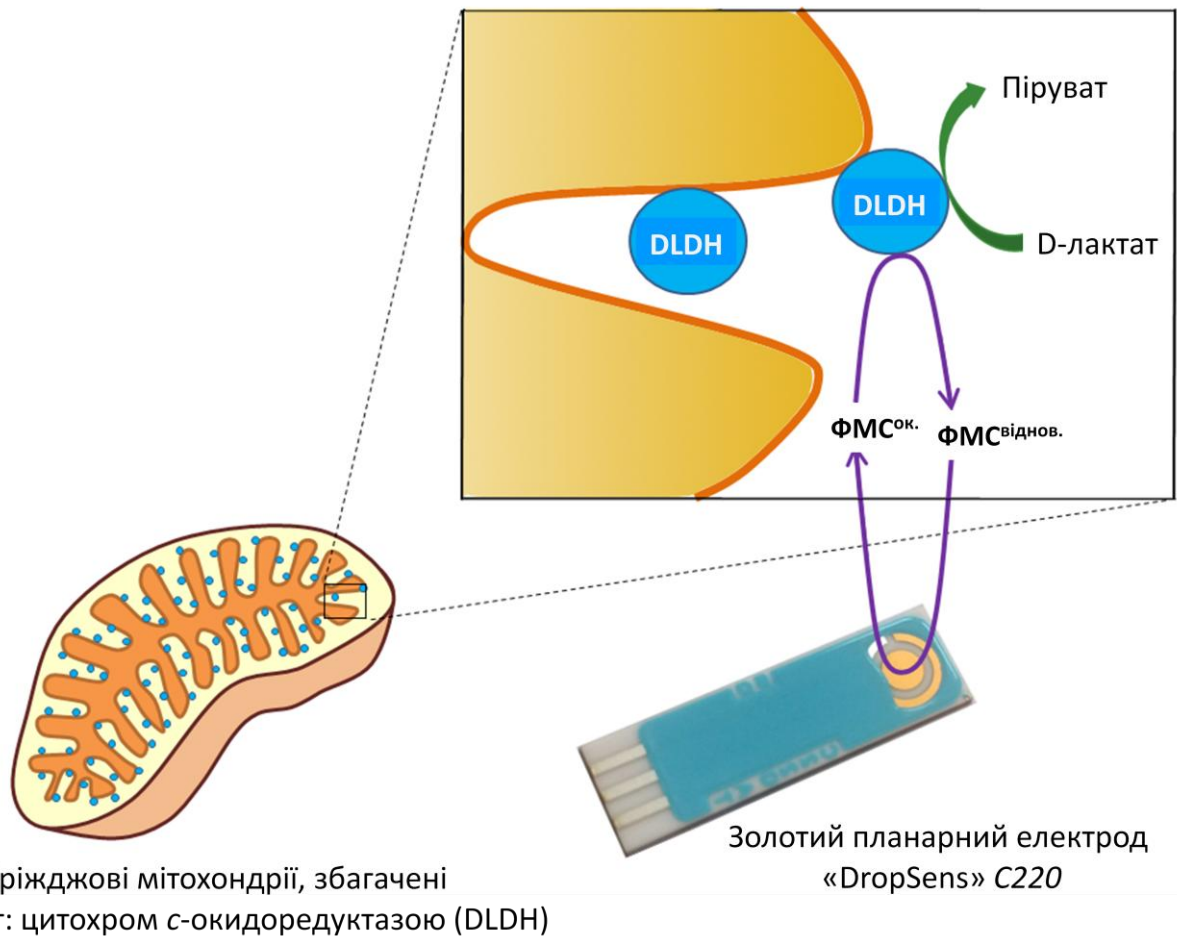


Рис. 11. Принципова схема D-лактат-селективних біосенсорів на основі використання субклітинних фракцій, збагачених мітохондріями, виділених із клітин *O. polymorpha* «trb», та низькомолекулярного медіатора перенесення електронів.

Розроблений D-лактат-селективний біосенсор протестовано на реальних зразках ферментованих молочних продуктів. Результати визначення D-лактату методом «множинних внесень стандарту» добре корелюють із літературними даними [Shapiro & Silanikove, 2010; Marrazza *et al.*, 1994].

ВИСНОВКИ

За допомогою генно-інженерних підходів сконструйовано дріжджові штами-надпродуценти L-лактат: ферицитохром *c*-оксидоредуктази (флавоцитохрому b_2 , ФЦ b_2) і D-лактат: ферицитохром *c*-оксидоредуктази (DLDH), оптимізовано умови синтезу цих ферментів і розроблено схеми їх виділення та очищення. На основі рекомбінантних клітин, клітинних уламків та очищених ферментів, у поєднанні із нанорозмірними матеріалами, розроблено нові спектрофотометричні та біосенсорні методи визначення L- та D-лактату та біореактора для біоконверсії енантіомерів лактату. Розроблені підходи використано для аналізу вмісту L- та D-лактату в реальних зразках рідин людини, харчових продуктів та фармацевтичних препаратів трансфузійного призначення.

Основні наукові та практичні результати роботи викладено у наступних висновках:

1. За допомогою генно-інженерних підходів сконструйовано рекомбінантні штами дріжджів *O. polymorpha*: «tr1» (*gcr1 catX CYB2*) – надпродуцент ФЦ b_2 та *O. polymorpha* «tr6» (*gcr1 catX cyb2Δ/DLD1*) – продуцент DLDH. Штам *O. polymorpha* «tr1» характеризується восьмикратним підвищенням питомої активності відповідного ферменту. Рекомбінантний штам *O. polymorpha* «tr6» не виявляє активності ФЦ b_2 , водночас, питома активність DLDH збільшується у шість разів, порівняно з вихідними штамми.

2. Оптимізовано умови синтезу цільових ферментів для обох рекомбінантних штамів дріжджів. Культуральне середовище, що містить 1% глюкозу і 0,2% рацемат лактату, є оптимальним для максимальної продукції ФЦ b_2 клітинами *O. polymorpha* «tr1», а пік активності відповідного фермента відповідає 24-й годині росту клітин. Водночас, середовище, яке містить 1% етанол і 0,5% рацемат лактату – оптимальне для вирощування штаму *O. polymorpha* «tr6» із найвищою питомою активністю DLDH на 48-у годину росту клітин.

3. Уперше розроблено новий метод очищення ФЦ b_2 із екстрактів клітин штаму дріжджів *O. polymorpha* «tr1» афінною хроматографією на амінопропілсилохромі, модифікованому цитохромом *c* в ролі ліганда. Опрацьовано схему очищення DLDH із клітин штаму дріжджів *O. polymorpha* «tr6». Для обох ферментних препаратів проведено фізико-хімічну та ензимологічну характеристику.

4. На основі очищеного ФЦ b_2 та клітин *O. polymorpha* «tr6» створено лабораторні прототипи колонкових біореакторів для конверсії рацемату молочної кислоти до оптично чистого D-ізомера та усунення токсичного D-лактату на модельних сумішах молочно-кислих продуктів. Показано, що ефективність усунення D-лактату іммобілізованими в альгінатному гелі клітинами значним чином залежить від швидкості потоку через біореактор. Доведено можливість використання продуцентів L- та D-лактат-специфічних оксидоредуктаз для продукції чистого D-енантіомера із рацемату молочної кислоти та усунення D-лактату в модельних сумішах.

5. Уперше розроблено новий ензиматично-фотометричний метод кількісного аналізу L-лактату за використання рекомбінантного ФЦ b_2 та «Берлінської блакиті». Опрацьовано спосіб реутилізації фермента для визначення вмісту L-лактату за використання ФЦ b_2 , іммобілізованого на магнітних мікрочастинках. Розроблено новий фотометричний метод аналізу D-лактату на основі використання клітин та субклітинних фракцій дріжджів *O. polymorpha* «tr6» та утворення формазану як кінцевого кольорового продукту.

6. Синтезовано нанорозмірні носії ферментів на основі золота. Розроблено новий метод формування золотих наночастинок на поверхні робочого планарного електроду *in situ*. За використання сканувальної електронної мікроскопії, рентгеноспектрального аналізу, атомно-силової мікроскопії та трансмісійної електронної мікроскопії проведено фізико-хімічну і структурну характеристику отриманих наноматеріалів.

7. Уперше використано поєднання генетичної інженерії та нанотехнологій при формуванні клітинного біоселективного елементу амперометричного біосенсора на L-лактат. Показано, що збагачення клітин *O. polymorpha* ФЦ b_2 , за рахунок надекспресії відповідного гена та додаткового введення в клітини золотих наночастинок з іммобілізованим ферментом, суттєво покращує основні операційні характеристики біосенсора.

8. На основі пермеабілізованих клітин штаму-надпродуцента ФЦ b_2 *O. polymorpha* «tr1» сконструйовано нові мікробні амперометричні біосенсори з покращеними біоаналітичними характеристиками. Створено новий ензимний безмедіаторний амперометричний біосенсор «третього покоління» на L-лактат на основі очищеного рекомбінантного ФЦ b_2 та наночастинок золота.

9. Розроблено та охарактеризовано нові мікробні біосенсори на D-лактат з використанням клітинних уламків, субклітинних фракцій, збагачених мітохондріями, та клітин рекомбінантного штаму *O. polymorpha* «tr6». Завдяки делеції гена *CYB2*, який кодує L-лактат-селективний флавоцитохром b_2 , мікробні біосенсори характеризуються високою селективністю до D-енантіомера лактату.

10. Уперше використано препарати ФЦ b_2 для неінвазійного ензиматичного та біосенсорного моніторингу вмісту L-лактату в біологічних рідинах людини (поті, слині) та безпосередньо при контакті біоелектрода зі шкірою.

11. Розроблені біоаналітичні підходи на основі рекомбінантних клітин, клітинних уламків та очищених ферментів використано для кількісного аналізу L- та D-лактату в реальних зразках рідин людини, харчових продуктів та фармацевтичних препаратів трансфузійного призначення. Завдяки високій чутливості та селективності, а також надійності та простоті у використанні, опрацьовані ензиматичні та мікробні підходи аналізу вмісту лактату можуть знайти практичне використання в клінічній діагностиці, спортивній медицині та харчових технологіях.

ПЕРЕЛІК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА РЕЗУЛЬТАТАМИ ДИСЕРТАЦІЙНОЇ РОБОТИ

Статті:

1. **Smutok O.**, Dmytruk K., Gonchar M., Sibirny A., Schuhmann W. Permeabilized cells of flavocytochrome b_2 over-producing recombinant yeast *Hansenula polymorpha* as biological recognition element in amperometric lactate biosensors // **Biosens. & Bioelectron.** – 2007. – V. 23, N 5. – P. 599–605. (IF – **5,14**) (Здобувачу належить ідея проведення досліджень, здійснення основних експериментів, узагальнення результатів та підготовка публікації).
2. Dmytruk K.V., **Smutok O.V.**, Ryabova O.B., Gayda G.Z., Sibirny V.A., Schuhmann W., Gonchar M.V., Sibirny A.A. Isolation and characterization of mutated alcohol oxidases from the yeast *Hansenula polymorpha* with decreased affinity toward substrates and their use as selective elements of an amperometric biosensor // **ВМС**

- Biotechnol.** – 2007. – V. 7, N 1. – P. 33. (IF – **2,35**) (Здобувач спільно зі співавторами провів дослідження, взяв участь в аналізі отриманих даних, написанні та оформленні публікації).
3. Dmytruk KV, Smutok OV, Gonchar MV, Sibirnyy AA. Construction of flavocytochrome b_2 -overproducing strains of the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*) // **Microbiology** (Moscow). – 2008 – V. 77, N 2. – P 213–8. (IF – **0,72**) (Здобувачу належить ідея проведення досліджень, спільно із співавторами здійснення основних експериментів, узагальнення результатів та підготовка публікації).
 4. Demkiv O, Smutok O, Paryzhak S, Gayda G, Sultanov Y, Guschin D, Shkil H, Schuhmann W, Gonchar M. Reagentless amperometric formaldehyde-selective biosensors based on the recombinant yeast formaldehyde dehydrogenase // **Talanta**. – 2008. – V. 76, N 4 – P. 837–46. (IF – **3,21**) (Здобувач спільно із науковим консультантом та співавторами сформулював ідею цієї роботи, провів скринінг та електрохімічну характеристику осмії-вмісних полімерів та прийняв участь в оформленні публікації).
 5. Shkil H., Stoica L., Dmytruk K., **Smutok O.**, Gonchar M., Sibirny A., Schuhmann W. Bioelectrochemical detection of L-lactate respiration using genetically modified *Hansenula polymorpha* yeast cells overexpressing flavocytochrome b_2 // **Bioelectrochemistry**. – 2009. – V. 76, N 1–2. – P. 175–179. (IF – **2,65**) (Здобувач брав участь у проведенні основних експериментів, узагальненні отриманих результатів та підготовці публікації).
 6. T.B. Goriushkina, A.P.Orlova, O.V. **Smutok**, M.V. Gonchar, A.P. Soldatkin, S.V. Dzyadevych. Application of L-lactate–cytochrome c -oxidoreductase for development of amperometric biosensor for lactate determination // **Biopolymers and Cell**. – 2009. – V. 25, N 3. – P. 194–203. (Здобувач спільно із співавторами сформулював ідею цієї роботи, взяв участь в аналізі отриманих даних, написанні та оформленні публікації).
 7. **Smutok O.**, Broda D., Smutok H., Dmytruk K., Gonchar M. Chromate reducing activity of the *Hansenula polymorpha* recombinant cells overproducing flavocytochrome b_2 // **Chemosphere** – 2011. – V. 83, N 4. – P. 449–454 (IF – **3,21**) (Здобувач спільно із науковим консультантом та співавторами сформулював ідею цієї роботи, провів основні дослідження, взяв участь в аналізі отриманих даних, написанні та оформленні публікації).
 8. Sigawi S., **Smutok O.**, Demkiv O., Zakalska O., Gayda G., Nitzan Y., Nisnevich M., Gonchar M. Formaldehyde-oxidizing enzymes and genetically modified yeast *Hansenula polymorpha* cells in monitoring and removal of formaldehyde // **J. Biotechnol.** – 2011. – V. 153, N 3–4. – P. 138–144 (IF – **3,29**) (Здобувачу спільно із співавторами належить ідея цієї роботи та виконання експериментальних досліджень по конструюванню ензимного біореактора, а також, написання та оформлення публікації).

9. Dmytruk K., **Smutok O.**, Dmytruk O., Schuhmann W., Sibirny A. Construction of uricase-overproducing strain of *Hansenula polymorpha* and its application as biological recognition element in microbial urate biosensor // **BMC Biotechnol.** – 2011. – V. 11. – P. 58–66 (IF – **2,35**) (*Здобувач спільно із співавторами сформулював ідею цієї роботи та провів дослідження, взяв участь в аналізі отриманих даних, написанні та оформленні публікації*).
10. Smutok O., Karkovska M., Smutok H., Gonchar M. Flavocytochrome b_2 -Based Enzymatic Method of L-Lactate Assay in Food Products // **The Scientific World Journal.** – 2013. – V. 2013. Article ID 461284 – P. 6. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/461284> (IF – **1,73**) (*Здобувач спільно із науковим консультантом та співавторами сформулював ідею цієї роботи, спільно із співавторами провів дослідження, взяв участь в аналізі отриманих даних та написанні публікації*).
11. **Smutok O.**, Dmytruk K., Karkovska M., Schuhmann W., Gonchar M., Sibirny A. D-lactate-selective amperometric biosensor based on the cell debris of the recombinant yeast *Hansenula polymorpha* // **Talanta.** – 2014. – V. 125. – P. 227–232 (IF – **3,55**) (*Здобувач спільно із науковим консультантом та співавторами сформулював ідею цієї роботи, спільно із співавторами провів дослідження, взяв участь в аналізі отриманих даних, написанні та оформленні публікації*).
12. Stasyuk N., **Smutok O.**, Zakalskiy A., Zakalska O., Gonchar M. Methylamine-sensitive amperometric biosensor based on (His)₆-tagged *Hansenula polymorpha* methylamine oxidase immobilized on the gold nanoparticles // **BioMed Research International.** – 2014. – V. 2014. Article ID 480498. – P. 8 (IF – **2,14**) (*Здобувач провів фізико-хімічні дослідження наноструктурних матеріалів та статистичну обробку результатів, взяв участь в написанні та оформленні публікації*).
13. Karkovska M., **Smutok O.**, Stasyuk N., Gonchar M. L-lactate-selective microbial sensor based on flavocytochrome b_2 -enriched yeast cells using recombinant and nanotechnology approaches. // **Talanta.** – 2015. – V. 144. – P. 1195–1200 (IF – **4,04**) (*Здобувач спільно із науковим консультантом та співавторами сформулював ідею цієї роботи, спільно із співавторами провів дослідження, взяв участь в аналізі отриманих даних, написанні та оформленні публікації*).
14. M. Lesanavičius, O. **Smutok**, B. Valiauga, A. Marozienė, M. Gonchar, K. Krikštopaitis, N. Čėnas. Kinetic properties of flavocytochrome b_2 from *Hansenula polymorpha* // **Chemija.** – 2016. – V. 27, N 2. – P. 123–127. (IF – **0,54**) (*Здобувач спільно із співавторами провів ензимологічні дослідження фермента та статистичну обробку результатів, взяв участь в написанні та оформленні публікації*).
15. M. Karkovska, O. **Smutok**, M. Gonchar. "Laboratory prototype of bioreactor for oxidation of toxic D-lactate using yeast cells overproducing D-lactate cytochrome c oxidoreductase" // **BioMed Research International.** – 2016. – V. 2016. – P. 5.

- <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4652876> (IF – 2,48) (Здобувач спільно із науковим консультантом та співавторами сформулював ідею цієї роботи, спільно зі співавторами провів дослідження, взяв участь в оформленні отриманих даних та написанні публікації).
16. Карковська М.І., Смуток О.В., Гончар М.В. «Використання флавоцитохрому b_2 , іммобілізованого на магнітних мікрочастинках, в багатократному ензиматичному аналізі L-лактату» // *Вісник Львівського університету. Серія біологічна.* – 2016. – Т. 72. – С. 25–32. (Здобувач спільно із науковим консультантом та співавторами сформулював ідею цієї роботи, спільно зі співавторами провів дослідження, взяв участь в оформленні та написанні публікації).
 17. **Smutok O., Karkovska M., Serkiz Ya., Vus B., Čenas N., Gonchar M.** Development of a new mediatorless biosensor based on flavocytochrome b_2 immobilized onto gold nanolayer for non-invasive L-lactate analysis of human liquids // *Sensor & Actuators B.* – 2017. – V. 250. – P. 469–475 (IF – 5,67) (Здобувач спільно із науковим консультантом та співавторами сформулював ідею цієї роботи, спільно із співавторами провів дослідження, взяв участь в аналізі отриманих даних, написанні та оформленні публікації).
 18. О. В. Смуток, М. І. Карковська, Т. М. Прокопів, М.В. Гончар. «Оптимізація синтезу та розробка схеми очистки D-лактат : цитохром с оксидоредуктази рекомбінантного штама дріжджів *Ogatea (Hansenula) polymorpha* «tr6» // Біологічні Студії // *Studia Biologica* – 2018. – Т. 12, N 1. – С. 5–16. (Здобувачу належить ідея проведення досліджень, здійснення основних експериментів, узагальнення результатів та підготовка публікації).
 19. О. Смуток, М. Карковська, Н. Стасюк, М. Гончар. Виділення, очистка, стабілізація та характеристика флавоцитохрому b_2 із клітин надпродуцента *Ogatea polymorpha* «tr1» (*gcr1 catX CYB2*) // *Вісник Львівського університету. Серія біологічна.* – 2018. – Т. 77. – С. 3-15. (Здобувач спільно із співавторами провів дослідження, обробку результатів, взяв участь в написанні та оформленні публікації).
 20. **Smutok O., Karkovska M., Prokopiv T., Kavetskyu T., Sibirnyj W., Gonchar M.** D-lactate-selective amperometric biosensor based on the mitochondrial fraction of *Ogataea polymorpha* recombinant cells // *Yeast.* – 2018. – V. 2018. – P. 1–8. <https://doi.org/10.1002/yea.3372> (IF – 2,28) (Здобувач спільно із науковим консультантом та співавторами сформулював ідею цієї роботи, спільно із співавторами провів дослідження, взяв участь в аналізі отриманих даних, написанні та оформленні публікації).

Розділи в монографіях:

21. **Smutok O., Gayda G., Dmytruk K., Klepach H., Nisnevich M., Sibirny A., Puchalski C., Gonchar M., Sibirny V.** Amperometric Biosensors for Lactate, Alcohols, and Glycerol Assays in Clinical Diagnostics / “**Biosensors - Emerging Materials and**

- Applications**” (Ed. P. A. Serra), Rijeka, InTech, 2011, ISBN 978-953-307-328-6, pp. 401–446 (*Здобувач спільно із науковим консультантом та співавторами сформулював ідею цієї роботи, спільно із співавторами провів дослідження, взяв участь в аналізі отриманих результатів, написанні та оформленні публікації*).
22. Sibirny W., **Smutok O.**, Klepach H., Gayda G., Dmytruk K., Broda D., Gonchar M. Alcohol-selective amperometric biosensors based on natural and mutated alcohol oxidases / “**Nowoczesne metody analizy surowców rolniczych**” (pod red. C. Puchalskiego, G. Bartosza), Rzeszów, Uniwersytet Rzeszowski, 2011, ISBN 978-83-933173-4-9. S. 241–253 (*Здобувачу належить ідея проведення досліджень, здійснення основних експериментів, узагальнення результатів та участь у підготовці публікації*).
23. Karkovska M., **Smutok O.**, Dmytruk K., Gonchar M. Yeast flavocytochrome b_2 as a perspective tool in bioreduction and detection of chromate / In the Book “**Living Organisms and Bioanalytical Approaches for Detoxification and Monitoring of Toxic Compounds**” (Eds. A. Sibirny, D. Fedorovych, M. Gonchar, D. Grabek-Lejko), Rzeszów, University of Rzeszow, 2015, ISBN 978-83-7667-203-8, pp. 113–123 (*Здобувач спільно із науковим консультантом та співавторами сформулював ідею цієї роботи, провів дослідження, взяв участь в написанні та оформленні публікації*).
24. M Gonchar, **O Smutok**, M Karkovska, N Stasyuk, G.Gayda. Yeast-Based Biosensors for Clinical Diagnostics and Food Control / “**Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi**” (Ed. A. Sibirny), Springer, 2017, chapter 14, pp. 391–412. DOI 10.1007/978-3-319-58829-2_14 (*Здобувач спільно із науковим консультантом та співавторами сформулював ідею цієї роботи, взяв участь в написанні та оформленні публікації*).
25. Карковська М.І., Стасюк Н.Є., Гайда Г.З., **Смуток О.В.**, Гончар М.В. Наноматеріали у конструюванні біосенсорів біомедичного призначення / У книзі: “**Багатофункціональні наноматеріали для біології та медицини: молекулярний дизайн, синтез і застосування**” (за ред. Р.С. Стойки), Київ, Наук. Думка, 2017, ISBN 978-966-00-1564-7, с. 165–177. (*Здобувач спільно із науковим консультантом та співавторами сформулював ідею цієї роботи, взяв участь в оформленні результатів та написанні публікації*).

Птенти:

26. Gonchar M., **Smutok O.**, Os'mak H. Flavocytochrome b_2 -based enzymatic composition, method and kit for L-lactate. U.S Patent No. WO/2009/009656, 15.01.2009, publ. <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?WO=2009009656> (*Здобувач спільно із науковим консультантом та співавторами сформулював ідею цієї роботи, провів дослідження, взяв участь в аналізі отриманих даних, написанні та оформленні публікації*).
27. Гончар М.В., **Смуток О.В.**, Осьмак Г.С. Спосіб кількісного визначення вмісту L-лактату у продуктах харчування та біологічних рідинах. Патент на корисну

модель України № 45283 Опубл. Бюл. № 21, 10.11.2009 (Здобувач спільно із науковим консультантом та співавторами сформулював ідею цієї роботи, провів дослідження, взяв участь в аналізі отриманих даних, написанні та оформленні публікації).

Список тез доповідей на конференціях, з'їздах та симпозіумах, на яких були апробовані результати дисертації

1. Gayda G., **Smutok O.**, Zakalskyi A., Demkiv O., Klepach H., Zakalska O., Stasyuk N., Broda D., Potocka N., Gonchar M. Biosensors in food quality control // *Central European Congress of Life Sciences EUROBIOTECH 2010*. Krakow, Poland, September 20–22, 2010, Abstract book. – P. 26.
2. **Smutok O.**, Broda D., Smutok H., Dmytruk K., Gonchar M. Flavocytochrome b_2 and recombinant *Hansenula polymorpha* cells, overproducing this enzyme, as perspective tools for chromate bioremediation // *RECOOP HST Bridges in Life Sciences Fifth Annual Scientific Meeting Young Scientists Forum*. Lviv, Ukraine April 9-11, 2010, Biopolymers and Cell. 2010. V. 26, N2 (suppl.) – P. 115.
3. Gonchar M., **Smutok O.**, Gayda G., Zakalskiy A., Zakalska O., Karkovska M., Stasiuk N., Potocka N., Broda D. Nanosized biorecognition layers based on recombinant enzymes for the use in biosensorics // *1-st international symposium “Non-Conventional Yeasts in the Postgenomic Era”*. Lviv, Ukraine, September 11-14, 2011, Abstract book. – P. 77.
4. **Smutok O.**, Karkovska M., Gonchar M. Third-generation electrochemical biosensor for L-lactate analysis based on enzyme-modified gold nanoparticles // *4-th Polish-Ukrainian Weigl Conference „From microbiology to synthetic biology”*. Wroclaw, Poland, May 19–21, 2011, Sepsis 2011. V. 4, N1 (suppl.) –P.137.
5. **Smutok O.**, Karkovska M., Broda D., Gonchar M.. Recombinant *Hansenula polymorpha* cells overproducing flavocytochrome b_2 as a perspective tool for chromate bioremediation // *Intrnational Symposium on Cell Biology jointly with 3rd Ukrainian Congress for Cell Biology*. Yalta, Ukraine, May 16-20, 2012, Abstract book. – P.35.
6. Gonchar M., Stasyuk N., Karkovska M., **Smutok O.** Synthesis and bio-functionalization of nanocarriers by flavocytochrome b_2 from *Hansenula polymorpha* // *5 th Polish-Ukrainian Weigl Conference on Microbiology*. Chernivtsi, Ukraine, May 23-25, 2013, Abstract book. – P. 61.
7. Gonchar M., Sibirny A., **Smutok O.**, Dmytuk K., Karkovska M. Construction of D-lactate-selective microbial amperometric biosensor based on the recombinant yeast cells of *Hansenula polymorpha* // *5 th Polish-Ukrainian Weigl Conference on Microbiology*. Chernivtsi, Ukraine, May 23-25, 2013, Abstract book. – P. 73.
8. Karkovska M., **Smutok O.**, Gonchar M. Construction of improved microbial l-lactate-selective amperometric sensor based on flavocytochrome b_2 -enriched yeast cells // *International Symposium on Cell Biology jointly with 4rd Ukrainian Congress for Cell Biology*. Uzhhorod, Ukraine, September 17–20, 2014, Abstract book. – P. 32.

9. **Smutok O.**, Dmytruk K., Karkovska M., Gonchar M. SibirnyA. Construction of D-lactate-selective biosensor based on the cell debris of the recombinant yeast *Hansenula polymorpha* // *5th International Young Scientists Conference „Human - Nutrition - Environment” “Biotechnology for sustainable development”*. Rzeszow, Poland, April 24–25, 2014, Abstract book. – P. 73.
10. Gonchar M., Karkovska M., Stasyuk N., **Smutok O.** Gene and Protein Engineering in Production of the Enzymes of Analytical Importance // *27th International conference on yeast genetics and molecular biology*. Levico Terme, Italy, September 6–12, 2015, Abstract book. – P. 153.
11. Karkovska M., **Smutok O.** Flavocytochrome b_2 -bound magnetic microparticles and their application in L-lactate analysis // *International conference "Advances in Cell Biology and Biotechnology"*. Lviv, Ukraine, October 11–13, 2015, Abstract book. – P. 57.
12. Prokopiv T., Zakalska O., Zakalskiy A., Lavryk M., **Smutok O.**, Gonchar M. Ferromagnetic nanoparticles as the carriers for the immobilization of yeast recombinant enzymes // *International conference "Advances in Cell Biology and Biotechnology"* Lviv, Ukraine, October 11–13, 2015, Abstract book. – P. 66.
13. Karkovska M., **Smutok O.**, Stasyuk N., Gonchar M. L-lactate-selective microbial sensor based on flavocytochrome b_2 -enriched yeast cells using recombinant and nanotechnology approaches // *International conference "Advances in Cell Biology and Biotechnology"* Lviv, Ukraine, October 11–13, 2015, Abstract book. – P. 69.
14. Karkovska M., **Smutok O.**, Gonchar M. Application of recombinant yeast overproducing D-lactate cytochrome *c* oxidoreductase for removal of toxic D-lactate from fermented products // *International Symposium on Cell Biology jointly with 5th Ukrainian Congress for Cell Biology*. Odesa, Ukraine, October 2–6, 2016, Abstract book. – P. 18.
15. Prokopiv T., **Smutok O.**, Karkovska M., Sibirnyj W., Gonchar M. D-lactate-selective amperometric biosensor based on the mitochondrial fraction of *Ogataea (Hansenula) polymorpha* recombinant cells for dairy products control // *7th International Weigl Conference*. Lviv, Ukraine, September 26–29, 2017, Abstract book. – P.143.
16. **Smutok O.**, Karkovska M., Serkiz R., Vus B., Čenas N., Gonchar M. A. Novel mediatorless biosensor for non-invasive L-lactate analysis of human liquids // *7th International Weigl Conference*. Lviv, Ukraine, September 26–29, 2017, Abstract book. – P.153.
17. Gayda G., **Smutok O.**, Klepach H., Stasyuk N., Gonchar M. Microbial enzymes as the effective analytical tools for wine analysis // *III International Scientific Conference “Microbiology and Immunology – the Development Outlook in the 21st century”*. Kyiv, Ukraine, April 19-20, 2018, Abstract book. – P.42.
18. Gonchar M., Zakalskiy A., **Smutok O.**, Stasyuk N., Demkiv O., Prokopiv T., Zakalska O. Engineered microorganisms for analytical purposes // *International Conference*

“Advances in Microbiology and Biotechnology”, Lviv, Ukraine, October 29–31, 2018, Abstract book. – P.55.

19. **Smutok O.**, Kavetsky T., Serkiz R., Gonchar M. A novel mediatorless biosensor for non-invasive L-lactate analysis of human liquids based on flavocytochrome b_2 from *Ogatea polymorpha* immobilized on gold nanolayer // *International Conference “Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application”*. Rzeszow, Poland, May 15–18, 2018, Abstract book. – P.163.
20. **Smutok O.**, Prokopiv T., Kavetsky T., Sibirnyj W., Gonchar M. D-lactate-selective amperometric biosensor based on the mitochondrial fraction of *Ogataea polymorpha* recombinant cells // *International Conference “Advances in Microbiology and Biotechnology”*. Lviv, Ukraine, October 29–31, 2018, Abstract book. – P.56
21. **Smutok O.**, Karkovska M., Prokopiv T., Gonchar M. Optimization of synthesis and development of purification scheme for D-lactate: cytochrom c oxidoreductase from recombinant yeast *Ogataea (hansenula) polymorpha* // *International Conference “Advances in Microbiology and Biotechnology”*. Lviv, Ukraine, October 29–31, 2018, Abstract book. – P.95.
22. **Smutok O.**, Karkovska M., Stasyuk N., Gonchar M. Isolation, purification, stabilization and characterisation of flavocytochrome b_2 from overproducing cells of *Ogataea polymorpha* “tr1” (gcr1 catx cyb2) // *International Conference “Advances in Microbiology and Biotechnology”*. Lviv, Ukraine, October 29–31, 2018, Abstract book. – P.122.
23. Stasyuk N., Kukhazh Y., Hoivanovych N., **Smutok O.**, Demkiv O., Kavetsky T., Gonchar M. Improvement of amperometric laccase biosensor using gold nanoparticles coupling with ureasil polymer as a host matrix // *International Conference “Advances in Microbiology and Biotechnology”*. Lviv, Ukraine, October 29–31, 2018, Abstract book. – P.113.

АНОТАЦІЯ

Смуток О.В. L- і D-лактат-селективні оксидоредуктази, рекомбінантні клітини дріжджів *Ogataea polymorpha* та нанорозмірні матеріали для розробки нових ензиматичних і біосенсорних підходів кількісного аналізу молочної кислоти. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія. – Інститут біології клітини НАН України, Львів, 2019.

Дисертація присвячена конструюванню дріжджових штамів – надпродуцентів L- і D-лактат-селективних оксидоредуктаз, очищенню ферментів та розробці на їх основі, у поєднанні із нанорозмірними матеріалами, нових спектрофотометричних та біосенсорних методів визначення вмісту L- та D-лактату, а також біореакторів для ензиматичного отримання чистих енантіомерів молочної кислоти.

За допомогою молекулярно-генетичних підходів сконструйовано рекомбінантні штами дріжджів *Ogataea polymorpha*: «tr1» (*gcr1 catX CYB2*) - надпродуцент L-лактат: ферицитохром *c*-оксидоредуктази (флавоцитохрому b_2 , ФЦ b_2), що характеризується восьмикратним підвищенням питомої активності відповідного ферменту в безклітинних екстрактах. Сконструйовано також рекомбінантний продуцент D-лактат: ферицитохром *c*-оксидоредуктази (DLDH) *O. polymorpha* «tr6» (*gcr1 catX CYB2Δ/DLD1*), питома активність DLDH якого збільшується у шість разів, порівняно з вихідними штамми, причому завдяки делеції гена *CYB2* штам не синтезує ФЦ b_2 . Оптимізовано умови синтезу цільових ферментів для обох рекомбінантних штамів дріжджів.

Уперше розроблено новий метод очищення ФЦ b_2 із екстрактів клітин штаму дріжджів *O. polymorpha* «tr1» афінною хроматографією на амінопропілсилохромі, модифікованому цитохромом *c* в ролі ліганда та отримано препарати фермента із питомою активністю 10 Од·мг⁻¹. Опрацьовано схему очищення мембранного фермента DLDH із клітин штаму дріжджів *O. polymorpha* «tr6» та отримано очищений препарат із питомою активністю 1,1 Од·мг⁻¹. Для обох ферментних препаратів проведено фізико-хімічну та ензимологічну характеристику.

Доведено можливість використання продуцентів L- та D-лактат-специфічних оксидоредуктаз для продукції чистого D-енантіомера із рацемату молочної кислоти та усунення D-лактату в модельних сумішах.

Уперше розроблено новий ензиматично-фотометричний метод кількісного аналізу L-лактату за використання рекомбінантного ФЦ b_2 та «Берлінської блакиті». Опрацьовано спосіб реутилізації фермента для визначення вмісту L-лактату за використання ФЦ b_2 , іммобілізованого на магнітних мікрочастинках. Розроблено новий фотометричний метод кількісного аналізу D-лактату на основі використання клітин та субклітинних фракцій *O. polymorpha* «tr6» та утворення формазану як кінцевого кольорового продукту.

Синтезовано носії для іммобілізації ферментів на основі наночастинок золота. Розроблено новий метод формування золотих наночастинок на поверхні робочого планарного електроду *in situ*. За використання сканувальної електронної мікроскопії, рентгеноспектрального аналізу, атомно-силової мікроскопії та трансмісійної

електронної мікроскопії проведено фізико-хімічну і структурну характеристику отриманих наноматеріалів.

На основі пермеабілізованих клітин штаму-надпродуцента ФЦ *b₂* *O. polymorpha* «tr1» сконструйовано нові мікробні амперометричні біосенсиори з покращеними біоаналітичними характеристиками. Розроблено новий ензимний безмедіаторний амперометричний біосенсор «третього покоління» на L-лактат на основі очищеного рекомбінантного ФЦ *b₂* та наночастинок золота.

Розроблено та охарактеризовано нові мікробні біосенсиори на D-лактат з використанням клітинних уламків, субклітинних фракцій, збагачених мітохондріями, та клітин рекомбінантного штаму *O. polymorpha* «tr6». Завдяки делеції гена *CYB2*, який кодує L-лактат-селективний флавоцитохром *b₂*, мікробні біосенсиори характеризуються високою селективністю до D-енантіомера лактату.

Розроблені біоаналітичні підходи на основі рекомбінантних клітин, клітинних уламків та очищених ферментів використано для кількісного аналізу L- та D-лактату в реальних зразках рідин людини, харчових продуктів та фармацевтичних препаратів трансфузійного призначення. Завдяки високій чутливості та селективності, а також надійності та простоті у використанні, опрацьовані ензиматичні та мікробні підходи кількісного аналізу лактату можуть знайти практичне використання в клінічній діагностиці, спортивній медицині та харчових технологіях.

Ключові слова: L- і D-молочна кислота, L- і D-лактат-селективні оксидоредуктази, рекомбінантні дріжджі, біореактори, наноносії, ензиматичні набори, біоелектроди, амперометричні біосенсиори.

АННОТАЦІЯ

Смуток О.В. L- и D-лактат-селективные оксидоредуктазы, рекомбинантные клетки дрожжей *Ogataea polymorpha* и наноразмерные материалы для разработки новых ферментативных и биосенсорных подходов количественного анализа молочной кислоты. - На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.07 – микробиология. – Институт биологии клетки НАН Украины, Львов, 2019.

Диссертация посвящена конструированию дрожжевых штаммов – сверхпродуцентов L- и D-лактат-селективных оксидоредуктаз, очистке ферментов и разработке на их основе, в сочетании с наноразмерными материалами, новых спектрофотометрических и биосенсорных методов определения содержания L- и D-лактата, а также биореакторов для энзиматического получения чистых энантиомеров молочной кислоты.

С помощью молекулярно-генетических подходов сконструированы рекомбинантные штаммы дрожжей: *Ogataea polymorpha* «tr1» (*gcr1 catX CYB2*) – сверхпродуцент L-лактат: фероцитохром *c*-оксидоредуктазы (флавоцитохрома *b₂*, ФЦ *b₂*), характеризующийся восьмикратным повышением удельной активности соответствующего фермента в бесклеточных экстрактах, а также *O. polymorpha* «tr6» (*gcr1 catX CYB2Δ/DLD1*) – продуцент D-лактат: фероцитохром *c*-

оксидоредуктазы (DLDH), удельная активность DLDH которого увеличивается в шесть раз по сравнению с исходными штаммами, причем благодаря делеции гена *CYB2* клетки не синтезируют ФЦ b_2 . Оптимизированы условия синтеза целевых ферментов для обоих рекомбинантных штаммов дрожжей.

Впервые разработан новый метод очистки ФЦ b_2 из экстрактов клеток штамма дрожжей *O. polymorpha* «tr1» с помощью аффинной хроматографии на аминопропилсилохроме, модифицированном цитохромом *c* в роли лиганда и получены препараты фермента с удельной активностью 10 Ед·мг⁻¹. Разработана схема очистки мембранного фермента DLDH из клеток штамма дрожжей *O. polymorpha* «tr6» и получен очищенный препарат с удельной активностью 1,1 Ед·мг⁻¹. Для обоих ферментных препаратов изучены физико-химические и энзимологические характеристики.

Доказана возможность использования продуцентов L- и D-лактат-специфических оксидоредуктаз для продукции чистого D-энантиомера из рацемата молочной кислоты и для устранения D-лактата в модельных смесях.

Впервые разработан новый энзимо-фотометрический метод количественного анализа L-лактата с использованием рекомбинантного ФЦ b_2 и «Берлинской лазури». Предложен способ реутилизации фермента для определения содержания L-лактата с использованием ФЦ b_2 , иммобилизованного на магнитных микрочастицах. Разработан новый фотометрический метод количественного анализа D-лактата на основе использования клеток и субклеточных фракций *O. polymorpha* «tr6» и образования формазана как конечного цветного продукта.

Синтезированы носители для иммобилизации ферментов на основе наночастиц золота. Разработан новый метод формирования золотых наночастиц на поверхности рабочего планарного электрода *in situ*. С использованием сканирующей электронной микроскопии, рентгеноспектрального анализа, атомно-силовой микроскопии и трансмиссионной электронной микроскопии проведена физико-химическая и структурная характеристика полученных наноматериалов.

На основе пермеабилizированных клеток штамма-сверхпродуцента ФЦ b_2 *O. polymorpha* «tr1» сконструированы новые микробные биосенсоры с улучшенными биоаналитическими характеристиками. Разработан новый энзимный безмедиаторный биосенсор «третьего поколения» для определения содержания L-лактата с использованием очищенного рекомбинантного ФЦ b_2 и наночастиц золота.

Разработаны и охарактеризованы новые микробные биосенсоры на D-лактат с использованием клеточных обломков, субклеточных фракций, обогащенных митохондриями, а также клеток рекомбинантного штамма *O. polymorpha* «tr6». Благодаря делеции гена *CYB2*, кодирующего L-лактат-селективный флавоцитохром b_2 , микробные биосенсоры характеризуются высокой селективностью к D-энантиомеру лактата.

Разработанные биоаналитические подходы на основе рекомбинантных клеток, клеточных обломков и очищенных ферментов использованы для количественного анализа L- и D-лактата в реальных образцах биологических жидкостей человека, пищевых продуктов и фармацевтических препаратов трансфузионного назначения. Благодаря высокой чувствительности и селективности, а также надежности и

простоте в использовании, разработанные энзиматические и микробные подходы количественного анализа лактата могут найти практическое использование в клинической диагностике, спортивной медицине и пищевых технологиях.

Ключевые слова: L- и D-молочная кислота, L- и D-лактат-селективные оксидоредуктазы, рекомбинантные дрожжи, биореакторы, наноносители, энзиматические наборы, биоэлектроды, биосенсоры.

SUMMARY

Smutok O.V. L- and D-lactate-selective oxidoreductases, recombinant yeast cells of *Ogataea polymorpha* and nanomaterials for the development of new enzymatic and biosensor approaches for the quantitative analysis of lactic acid. – Manuscript.

Thesis for Doctor of Sciences degree in Biology (specialty 03.00.07 – microbiology). Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv, 2019.

The thesis is devoted to construction of yeast strains overproducers of L- and D-lactate-selective oxidoreductases, purification of the enzymes, their combination with nanosized materials, and development on the base of obtained bionanomolecules new spectrophotometric and biosensor approaches for analysis of L- and D-lactate, as well as bioreactors for enzymatic conversion of racemic lactic acid to pure enantiomers.

Using molecular genetics approaches, recombinant strain of yeast *Ogataea polymorpha*: "tr1" (*gcr1 catX CYB2*) – overproducer of L-lactate: ferricitochrome *c*-oxidoreductase (flavocytochrome *b*₂, FC *b*₂), characterized by an eight-fold increase in the specific activity of the enzyme, has been constructed. A recombinant producer of D-lactate: ferricitochrom *c*-oxidoreductase (DLDH) – *O. polymorpha* "tr6" (*gcr1 catX CYB2Δ/DLD1*), whose specific activity of DLDN is six-fold greater comparing with the parental strains, has been constructed also. Due to deletion of the *CYB2* gene, the strain is not synthesizes FC *b*₂. The conditions for the maximal enzymes synthesis for both recombinant yeast strains have been optimized.

Since the methods described in the literature for the isolation and purification of L- and D-lactate-specific oxidoreductase from yeast cells are low-effective, and in the world market today there are no commercial preparations of both enzymes, we have performed studies focused on development of effective schemes for isolation, purification and stabilization of these enzymes from thermostable recombinant strains of *O. polymorpha*. To ensure effective extraction of FC *b*₂ from the debris of yeast cells of *O. polymorpha* "tr1" and selected their optimal combination a screening of ionogenic and neutral detergents was carried out. For the first time, a new method of purifying FC *b*₂ from extracts of yeast strains *O. polymorpha* "tr1" by affinity chromatography on aminopropylsilocromes modified with cytochrome *c* in the role of a ligand has been developed, and preparations of the enzyme with a specific activity of 10 U·mg⁻¹ have been obtained. The scheme of purification of the membrane enzyme DLDN from the cells of *O. polymorpha* "tr6" has been developed and a purified enzyme preparation with a specific activity of 1.1 U·mg⁻¹ has been obtained. For both enzyme preparations, a physico-chemical and enzyme characteristic has been performed.

For the creation of laboratory prototypes of columnar bioreactors for the conversion of racemate of lactic acid to an optically pure D-isomer and the remediation of toxic

D-lactate from the model samples, preparations of purified FC b_2 and permeabilized *O. polymorpha* "tr6" cells immobilized in alginate gel were used. It has been shown that the efficacy of D-lactate remediation by cells greatly depends on the flow rate through a bioreactor. The possibility of using the yeast producers of L- and D-lactate-specific oxidoreductases for production of pure D-enantiomer from racemic lactic acid and remediation of D-lactate from the model samples has been proved.

For the first time a new enzymatic-photometric method of quantitative analysis of L-lactate based on recombinant FC b_2 and "Prussian blue" has been reported. The method of reusing of enzyme immobilized on ferromagnetic microparticles has been developed. It is shown that enzyme microparticles can be removed from the reaction solution by magnetic field and reused at least six times without loss of quality of L-lactate analysis.

A new photometric method of quantitative analysis of D-lactate based on the use of cell and subcellular fractions of *O. polymorpha* "tr6" and the formation of formazan as a final colored product has been developed.

The nanocarriers for immobilization of the enzymes based on gold nanoparticles were synthesized. A new method of gold nanoparticles formation on the surface of the working planar electrode *in situ* was developed. The physico-chemical and structural characteristics of the nanomaterials were performed by means scanning electron microscopy, X-ray spectral analysis, atomic force microscopy and transmitted electron microscopy.

On the basis of permeabilized cells *O. polymorpha* "tr1" - overproduced FC b_2 new microbial amperometric biosensors with improved bioanalytical characteristics have been constructed. The construction of new microbial amperometric biosensors with improved bioanalytical characteristics based on permeabilized FC b_2 -overproductive cells of *O. polymorpha* "tr1" enriched with an enzyme bound gold nanoparticles have been done. For the first time it has been shown that the enrichment of yeast cells of FC b_2 , due to the overexpression of the corresponding gene and the addition of immobilized enzyme gold nanoparticles into cells, significantly improves the main operational characteristics of the biosensor (sensitivity, detection limit, storage stability, *etc.*).

A new L-lactate-selective enzymatic mediatorless biosensor of the "third generation" based on purified recombinant FC b_2 and gold nanoparticles has been developed.

New microbial biosensors for D-lactate with the use of cell debris, subcellular fractions enriched with mitochondria, as well, the cells of recombinant strain *O. polymorpha* «tr6» have been developed and characterized. Due to the deletion of the *CYB2* gene encoding L-lactate-selective flavocytochrome b_2 , microbial biosensors are highly selective to the D- lactate enantiomer.

The developed bioanalytical approaches based on recombinant cells, cell debris, subcellular fractions enriched with mitochondria, as well, purified enzyme preparations were used for quantitative analysis of L- and D-lactate in the real samples of human liquids, food products and transfusion pharmaceuticals. Due to its high sensitivity and selectivity, as well as reliability and ease of use, the developed enzymatic and microbial approaches of quantitative analysis of lactate can be using practically in clinical diagnosis, sports medicine and food technology.

Key words: L-, D-lactic acid, L- and D-lactate-selective oxidoreductases, recombinant yeast, bioreactors, nanocarriers, enzymatic kits, bioelectrodes, amperometric biosensors.

Підписано до друку 16.04.2019. Формат 60x90/16
Папір офсетний. Гарнітура Times New Roman. Друк на різнографі.
Ук. Друк. Арк. 1,85. Наклад 100 прим. Замовлення № 01/04-19

Друкарня ПП «Арк-сервіс»
м. Львів, вул. Драгоманова 16, к. 3, Тел.: (032) 361-13-80