

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ КЛІТИНИ НАН УКРАЇНИ**

*На правах рукопису*

УДК 579.6: 577.152.1+549.9: 661.746.2

**СМУТОК ОЛЕГ ВОЛОДИМИРОВИЧ**

**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

Дисертація

на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

Науковий консультант:  
доктор біологічних наук,  
професор М. В. Гончар

Львів – 2019

## 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 з'ясуванню потенціалу поєднання генно-інженерних підходів та нанотехнологій для створення нових селективних біоаналітичних методів і продуктів для аналізу L- та D-молочної кислоти, придатних для використання у клінічній діагностиці, фармацевтиці, спортивній медицині та харчових технологіях.

У дисертаційній роботі реалізовано такі основні завдання: конструювання дріжджових штамів – надпродуцентів L- і D-лактат-селективних оксидоредуктаз *Ogataea polymorpha*; очистка цільових ферментів та їх характеристика; розробка на їх основі, у поєднанні із нанорозмірними матеріалами, нових спектрофотометричних і амперометричних методів визначення вмісту L- та D-лактату; створення біореакторів для продукції чистого D-енантіомера із рацемату молочної кислоти та усунення D-лактату в модельних сумішах за використання відповідних L- і D-лактат-селективних оксидоредуктаз.

Для створення продуцентів L- та D-лактат: ферицитохром *c*-оксидоредуктаз сконструйовано рекомбінантні штами метилотрофних дріжджів *O. polymorpha*. Основна ідея досліджень полягала у клонуванні відповідних генів (*CYB2* для L-лактат: ферицитохром *c*-оксидоредуктази, флавоцитохрому *b<sub>2</sub>*, ФЦ *b<sub>2</sub>*) та *DLD1* (для D-лактат: ферицитохром *c*-оксидоредуктази, *DLDH*) під сильний

конститутивний промотор *pAOX* у складі вектора мультикопійної інтеграції pGLG61. Як реципієнтний, використано мутантний штам *O. polymorpha* C-105 (*gcr1 catX*), який характеризується порушеною глюкозною катаболітною репресією, що забезпечує конститутивне функціонування промотора *AOX*, а також пошкоджено ген каталази, що полегшує виділення цільових ферментів без домішок каталази. Таким чином, отримано рекомбінантний штам дріжджів *O. polymorpha* «tr1» (*gcr1 catX CYB2*) - надпродуцент ФЦ  $b_2$ , що характеризується восьмикратним підвищенням питомої активності відповідного ферменту, та продуцент DLDH - *O. polymorpha* «tr6» (*gcr1 catX cyb2Δ/DLD1*), питома активність DLDH якого збільшилась у шість разів, порівняно з вихідними штамми. Для позбавлення специфічної L-лактат: цитохром *c* оксидоредуктазної активності у продуцента DLDH, проведено делецію гена *CYB2* у батьківському штамі *O. polymorpha* C-105 (*gcr1 catX*), а вже на наступному етапі, гомологічний ген *DLD1* надекспресовано в штамі *cyb2Δ* під контролем сильного конститутивного промотора гена *AOX*. Для обох рекомбінантних штамів дріжджів оптимізовано умови синтезу цільових ферментів.

Оскільки описані в літературі методи виділення L- та D-лактат-специфічних оксидоредуктаз із клітин дріжджів є низькоефективні, а на світовому ринку на сьогодні відсутні комерційні препарати обох ферментів, нами проведено дослідження, спрямовані на розробку ефективних схем виділення, очистки і стабілізації цих ферментів із термотолерантних рекомбінантних штамів *O. polymorpha*. Для забезпечення ефективної екстракції ФЦ  $b_2$  із уламків клітин дріжджів *O. polymorpha* «tr1», проведено скринінг іоногенних та нейтральних детергентів та підібрано оптимальне їх поєднання. 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<sup>-1</sup>. Опрацьовано схему очищення мембранного фермента DLDH із клітин штаму дріжджів *O. polymorpha* «tr6» та отримано очищений препарат із питомою активністю 1,1 Од·мг<sup>-1</sup>. Для обох ферментних препаратів проведено фізико-хімічну та ензимологічну характеристику.

Для створення лабораторних прототипів колонкових біореакторів для конверсії рацемату молочної кислоти до оптично чистого D-ізомера та усунення токсичного D-лактату на модельних сумішах використано препарати очищеного ФЦ *b<sub>2</sub>* та пермеабілізовані клітини *O. polymorpha* «tr6», іммобілізовані в альгінатному гелі. Показано, що ефективність усунення D-лактату клітинами значним чином залежить від швидкості потоку через біореактор. Доведено принципова можливість використання продуцентів L- та D-лактат-специфічних оксидоредуктаз для продукції чистого D-енантіомера із рацемату молочної кислоти та усунення D-лактату із модельних сумішей.

Уперше розроблено новий ензиматично-фотометричний метод кількісного аналізу L-лактату за використання рекомбінантного ФЦ *b<sub>2</sub>* та «Берлінської блакиті». На сонові розробленого підходу створено ензиматичний набір для кількісного визначення L-лактату та одержано Патент на винахід США (№. WO/2009/009656) та Патент на корисну модель України (№ 45283). Параметри опрацьованого ензиматичного набору для кількісного аналізу L-лактату порівняно з найближчими комерційними аналогами та показано його переваги за більшістю характеристик. Опрацьовано спосіб реутилізації фермента для визначення вмісту L-лактату за використання ФЦ *b<sub>2</sub>*, 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  $b_2$  *O. polymorpha* «tr1» сконструйовано нові мікробні амперометричні біосенсори та вперше показано, що збагачення клітин дріжджів ФЦ  $b_2$ , за рахунок надекспресії відповідного гена та додаткового введення в клітини золотих наночастинок з іммобілізованим ферментом, суттєво покращує основні операційні характеристики біосенсора (чутливість, порогову межу визначення, стабільність при зберіганні).

Розроблено новий ензимний безмедіаторний амперометричний біосенсор «третього покоління» на L-лактат на основі очищеного рекомбінантного ФЦ  $b_2$  та наночастинок золота. Основні параметри цього L-лактат-селективного біосенсора порівняно із найближчими комерційними аналогами та показано, що він їх переважає, перш за все, за чутливістю та коротшою тривалістю аналізу.

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. У порівнянні із єдиним описаним аналогом - біосенсором на основі DLDH із пекарських дріжджів, розроблений мікробний біосенсор на основі *O. polymorpha* «tr6» характеризується 18-кратно нижчою межею виявлення D-лактату та 53-кратним підвищенням чутливості.

Розроблені біоаналітичні підходи на основі рекомбінантних клітин, клітинних уламків та очищених ферментів використано для кількісного аналізу L- та D-лактату в реальних зразках біологічних 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 у клінічній діагностиці, фармацевтиці, спортивній медицині та харчових технологіях.

Отже, під час виконання дисертаційної роботи, за допомогою використання різних підходів продемонстровано позитивний потенціал поєднання генетичної інженерії дріжджів та нанотехнологій для створення нових селективних біоаналітичних методів і продуктів для кількісного аналізу L- та D-молочної кислоти, придатних для практичного використання.

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

## SUMMARY

**Smutok O.V. "L- and D-lactate-selective oxidoreductases, recombinant yeast cells of *Ogataea polymorpha* and nanomaterials for development of new enzymatic and biosensor approaches of 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 the clarification of the potential of combination of genetic engineering techniques and nanotechnologies to create new selective bioanalytical methods and products for the analysis of L- and D-lactic acid, suitable for use in clinical diagnostics, pharmacology, sports medicine, and food technologies.

In the thesis, the following main tasks have been realized: construction of yeast strains overproducing L- and D-lactate-selective oxidoreductases of *Ogataea polymorpha*; purification and characterization of the enzymes; their combination with nanosized materials; development on the use of the obtained bionanomolecules of new spectrophotometric and amperometric approaches for quantitative analysis of L- and D-lactate; construction on the base of L- and D-lactate-selective oxidoreductases of bioreactors for enzymatic conversion of racemic lactic acid to pure enantiomers.

The recombinant overproducer strains of L- and D-lactate-selective oxidoreductases have been constructed based on the methylotrophic yeast *O. polymorpha*. The main idea of the research was to clone the corresponding genes (*CYB2* for L-lactate: ferricytochrome *c*-oxidoreductase (flavocytochrome  $b_2$ , FC  $b_2$ ) and *DLD1* (for D-lactate: ferricytochrome *c*-oxidoreductase (DLDH) under the strong constitutive promoter *pAOX* inside of multi copies vector pGLG61. The mutant strain of *O. polymorpha* C-105 (*gcr1 catX*), devoid of catabolite repression by glucose, resulting in a constitutive synthesis of the enzymes under *pAOX* promoter. Moreover, the strain contains the damaged catalase gene, which is helpful for isolation of the target enzymes without catalase impurity. The recombinant strain named as *O. polymorpha* «tr1» (*gcr1 catX CYB2*), overproducer of FC  $b_2$ , characterized by an eight-fold increase in the specific activity of the enzyme in cell-free extracts, was constructed. It was created also a recombinant producer of DLDH – *O. polymorpha* "tr6" (*gcr1 catX CYB2Δ/DLD1*), with six-fold higher DLDH specific activity compared with the parental strains. This strain does not synthesize FC  $b_2$  due to deletion of the *CYB2* gene in the parental strain *O. polymorpha* C-105 (*gcr1 catX*). Optimization of growth conditions for both recombinant yeast strains, with respect to the maximal synthesis of the enzymes, has been done.

Since the methods described in the literature for isolation and purification of L- and D-lactate-specific oxidoreductases from yeast cells are low-effective, and the

absence on the world market of commercial preparations of both enzymes, we have performed studies focused on development of effective schemes for isolation, purification and stabilization of these enzymes from recombinant strains of the thermotolerant yeast *O. polymorpha*. To ensure effective extraction of FC  $b_2$  from the debris of *O. polymorpha* "tr1" cells, a screening of ionic and neutral detergents was carried out. For the first time, a new method of FC  $b_2$  purification from cell-free extracts of *O. polymorpha* "tr1" by affinity chromatography on aminopropylsilicic acid, modified with cytochrome *c* as a ligand, has been developed, and preparations of the enzyme with a specific activity of  $10 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$  have been obtained. The scheme of purification of the membrane-bound enzyme DLDH from the cells of *O. polymorpha* "tr6" has been optimized and a purified enzyme preparation with a specific activity of  $1.1 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$  has been obtained. The physico-chemical and enzymatic characteristics of the both enzyme preparations has been done.

To create laboratory prototypes of column bioreactors for the conversion of lactic acid racemate to an optically pure D-isomer and for removal 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 removal 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 removal of D-lactate from the model samples has been proved.

A new enzymo-photometric method of quantitative analysis of L-lactate, based on recombinant FC  $b_2$  and "Prussian blue", has been reported for the first time. On the base of the developed approach, an enzymatic kit for the quantitative determination of L-lactate was created and patented (U.S. Patent No. WO/2009/009656 and Patent of Ukraine No. 45283). The main parameters of the developed enzymatic kit for quantitative analysis of L-lactate were compared to the nearest commercial analogues



and its advantages in the most characteristics have been shown. The method of reuse of enzyme, immobilized onto ferromagnetic microparticles, has been developed. It was shown that enzyme-bound microparticles can be easily removed from the reaction mixture by magnetic field and be reused without a loss of quality of L-lactate analysis at least six times.

A new photometric method of quantitative analysis of D-lactate, based on the use of cells and subcellular fractions of *O. polymorpha* "tr6" and 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 for gold nanoparticles formation on the surface of the working planar electrode *in situ* has been developed. The physico-chemical and structural characteristics of the nanomaterials have been obtained using scanning electron microscopy, X-ray spectral analysis, atomic force microscopy and transmission electron microscopy.

The construction of new microbial amperometric biosensors with improved bioanalytical characteristics, based on permeabilized FC  $b_2$ -overproducing cells of *O. polymorpha* "tr1" and enriched with the enzyme-bound gold nanoparticles, has been done. It was shown for the first time that enrichment of yeast cells by FC  $b_2$ , due to the overexpression of the corresponding gene and introducing enzyme-bound gold nanoparticles into the yeast cells, significantly improves the main operational characteristics of the biosensor (sensitivity, detection limit, storage stability). Moreover, 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 and characterized. The main parameters of the L-lactate-selective biosensor were compared with the nearest commercial analogues. It has been shown a predomination of the sensor characteristics, primarily due to the higher sensitivity and shorter time of the analysis.

New microbial biosensors for D-lactate analysis based on cell debris, subcellular fractions enriched with mitochondria, as well on 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. Compared to the only described analogue, a biosensor based on DLDH from baker's yeast, a microbial biosensor based on *O. polymorrha* "tr6" was characterized by a 18-fold lower D-lactate detection limit and a 53-fold increase in sensitivity.

The developed bioanalytical approaches based on recombinant cells, cell debris, subcellular fractions enriched with mitochondria, as well on purified enzyme preparations have been used for quantitative analysis of L- and D-lactate in the real samples of human biological liquids, food products and transfusion pharmaceuticals. Due to a high sensitivity and selectivity, as well as reliability and easy usage, the developed enzymatic and microbial approaches for quantitative analysis of lactate can be widely used in clinical diagnostics, sports medicine, and food technology.

During the preparation of the thesis, the positive potential of the combination of yeast genetic engineering and nanotechnology to create new selective bioanalytical methods and products for quantitative analysis of L- and D-lactic acid, suitable for practical usage has been demonstrated.

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

## ПЕРЕЛІК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

(\* - рівноцінний вклад у роботу)

### 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. – P. 33–40. (IF – **2,35**) (Здобувач спільно зі співавторами провів дослідження, взяв участь в аналізі отриманих даних, написанні та оформленні публікації).
3. Dmytruk K.V., **Smutok O.V.**, Gonchar M.V., Sibirny A.A. 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. Goriushkina T.B., Orlova A.P., **Smutok O.V.**, Gonchar M.V., Soldatkin A.P., Dzyadevych S.V. 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*<sub>2</sub> // **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*<sub>2</sub>-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)<sub>6</sub>-tagged *Hansenula polymorpha* methylamine oxidase immobilized on the gold nanoparticles // **BioMed Research International**. – 2014. – V. 2014. Article ID 480498. – P. 1–8 <http://dx.doi.org/10.1155/2014/480498> (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*<sub>2</sub>-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. Lesanavičius M., **Smutok O.**, Valiauga V., Marozienė A., Gonchar M., Krikštopaitis K., Čėnas N. Kinetic properties of flavocytochrome *b*<sub>2</sub> 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. Karkovska M., **Smutok O.**, Gonchar M. 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. Article ID 4652876. – P. 1–5. <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. DOI: /10.1016/j.snb.2017.04.192 (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. **Смуток** О.В., Карковська М.І., Прокопів Т.М., Гончар М.В. Оптимізація синтезу та розробка схеми очистки D-лактат : цитохром  $c$  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. **Смуток** О., Карковська М., Стасюк Н., Гончар М. 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. **Gonchar M., Smutok O., Karkovska M., Stasyuk N., Gayda G.** 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).

#### **Патенти:**

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., Осмак 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., Dmytruk 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 // *27<sup>th</sup> 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.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ .....	27
ВСТУП.....	29
Розділ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	41
1.1. Засвоєння лактату у дріжджів .....	41
1.2. Характеристика L-лактат:ферицитохром <i>c</i> -оксидоредуктази (флавоцитохрому $b_2$ , ФЦ $b_2$ ) дріжджів .....	43
1.3. Характеристика D-лактат:ферицитохром <i>c</i> -оксидоредуктази (DLDH) дріжджів.....	48
1.4. Генетична регуляція синтезу флавоцитохрому $b_2$ у дріжджів .....	51
1.5. Генетична регуляція синтезу D-лактат:ферицитохром <i>c</i> -оксидоредуктаз у дріжджів.....	55
1.6. Генетична регуляція засвоєння лактату дріжджами при підвищеній температурі .....	59
1.7. Лактат-селективні ферменти як біоаналітичний інструмент при визначенні вмісту L- і D-лактату .....	61
1.7.1. Ензиматичні методи визначення вмісту молочної кислоти.....	63
1.7.1.1. Методи аналізу лактату на основі $\text{NAD}^+$ -залежної лактатдегідрогенази із м'язів ссавців.....	63
1.7.1.2. Визначення молочної кислоти з використанням бактерійної лактатоксидази.....	65
1.7.1.3. Визначення вмісту лактату на основі ФЦ $b_2$ .....	66
1.7.1.4. Визначення D-лактату за використання DLDH .....	68
1.7.2. Біосенсорні підходи визначення L- і D-молочної кислоти .....	68
1.7.2.1. Біосенсори на основі $\text{NAD}^+$ -залежної лактатдегідрогенази.....	69
1.7.2.2. Біосенсори на основі бактерійної лактатоксидази.....	71
1.7.2.3. Біосенсори на основі поєднання бактерійної лактатоксидази	

та NAD <sup>+</sup> -залежної лактатдегідрогенази .....	73
1.7.2.4. Біосенсори на основ ФЦ <i>b</i> <sub>2</sub> .....	74
1.7.2.5. Біосенсори на основі DLDH .....	75
1.8. Використання наносіїв для конструювання	
лактат-селективних біосенсорів .....	76
1.8.1. Біосенсори на основі NAD <sup>+</sup> -залежної лактатдегідрогенази та	
наносіїв різної природи .....	76
1.8.2. Біосенсори на основі бактерійної лактатоксидази та	
нанорозмірних носіїв .....	78
1.9. Підсумки .....	79
Розділ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ .....	81
2.1. Об'єкти дослідження .....	81
2.2. Основні молекулярно-генетичні методи .....	81
2.2.1. Плазмідні .....	81
2.2.2. Праймери .....	82
2.2.3. Поживні середовища та умови культивування .....	82
2.2.4. Виділення сумарної ДНК з клітин дріжджів .....	83
2.2.5. Трансформація клітин мікроорганізмів .....	84
2.2.6. Базові молекулярно-генетичні методи .....	85
2.2.7. Програмне забезпечення для пошуку та аналізу нуклеотидних	
послідовностей .....	85
2.3. Мікробіологічно-біохімічні методи .....	86
2.3.1. Визначення концентрації клітин .....	86
2.3.2. Пермеабілізація клітин <i>O. polymorpha</i> .....	86
2.3.3. Виділення субклітинних фракцій клітин <i>O. polymorpha</i> ,	
збагачених мітохондріями .....	87
2.3.4. Отримання безклітинного екстракту .....	88

2.3.5. Визначення концентрації білка.....	88
2.3.6. Визначення активності флавоцитохрому $b_2$ та DLDH.....	88
2.3.7. Визначення активності алкогольоксидази (АО) .....	90
2.3.8. Визначення вмісту лактату ензиматичним методом на основі NAD <sup>+</sup> -залежної ЛДГ .....	90
2.3.9. Проведення нативного електрофорезу та виявлення зон лактатдегідрогеназної активності ФЦ $b_2$ в ПААГ .....	90
2.3.9.1. Умови проведення електрофорезу.....	90
2.3.9.2. Проявлення зон лактатдегідрогеназної активності ФЦ $b_2$ .....	91
2.3.10. Проведення SDS-електрофорезу.....	92
2.3.11. Виділення та очищення флавоцитохрому $b_2$ із клітин рекомбінантних дріжджів <i>O. polymorpha</i> .....	92
2.3.12. Виділення та очищення DLDH із клітин рекомбінантних дріжджів <i>O. polymorpha</i> .....	94
2.3.13. Дослідження спектрів поглинання ФЦ $b_2$ <i>O. polymorpha</i> .....	95
2.4. Розробка біосенсорного методу аналізу лактату.....	95
2.4.1. Конструювання амперометричних лактат-селективних біосенсорів.....	95
2.4.2. Формування біочутливого елемента біосенсора на основі ферментних препаратів, клітинних уламків, субклітинних фракцій та клітин рекомбінантних штамів <i>O. polymorpha</i> .....	97
2.4.3. Амперометричні вимірювання.....	98
2.4.4. Сканувальна електрохімічна мікроскопія (SECM).....	99
2.5. Методи синтезу та характеристики золотих наночастинок .....	100
2.5.1. Синтез золотих наночастинок (Au-НЧ) .....	100
2.5.2. Синтез золотих наночастинок <i>in situ</i> на поверхні золотих планарних електродів.....	100
2.5.3. Сканувальна електронна мікроскопія і рентгеноспектральний аналіз ....	100

2.5.4. Атомно-силова мікроскопія .....	101
2.5.5. Трансмійна електронна мікроскопія.....	101
2.6. Біофункціоналізація нано- та мікрочастинок .....	101
2.6.1. Імобілізація ФЦ $b_2$ на поверхні Au-НЧ.....	101
2.6.2. Імобілізація ФЦ $b_2$ на поверхні феромагнітних мікрочастинок.....	102
2.7. Статистичний аналіз експериментальних даних.....	102
Розділ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	104
3.1. Генно-інженерне конструювання штамів – продуцентів L- та D-лактат: ферицитохром <i>c</i> -оксидоредуктаз на основі дріжджів <i>O. polymorpha</i> .....	105
3.1.1. Генно-інженерне конструювання штамів – продуцентів ФЦ $b_2$ <i>O. polymorpha</i> .....	106
3.1.2. Скринінг генетицин-резистентних трансформантів із підвищеною активністю ФЦ $b_2$ .....	109
3.1.3. Генно-інженерне конструювання штамів – продуцентів DLDH <i>O. polymorpha</i> .....	110
3.1.4. Підсумки.....	114
3.2. Оптимізація умов для надсинтезу L- та D-лактат:ферицитохром <i>c</i> -оксидоредуктаз рекомбінантними штамми дріжджів.....	114
3.2.1. Оптимізація умов синтезу ФЦ $b_2$ клітинами надпродуцента <i>O. polymorpha</i> «tr1» ( <i>gcr1 catX CYB2</i> ).....	114
3.2.2. Оптимізація синтезу DLDH клітинами надпродуцента <i>O. polymorpha</i> «tr6» ( <i>gcr1 catX cyb2Δ/DLD1</i> ).....	117
3.2.3 Підсумки.....	123
3.3. Оптимізація виділення та очистки L- та D-лактат:ферицитохром <i>c</i> -оксидоредуктаз із рекомбінантних штамів дріжджів <i>O. polymorpha</i> .....	124
3.3.1. Оптимізація виділення та очистки флавоцитохрому $b_2$ з клітин рекомбінантного штаму <i>O. polymorpha</i> «tr1» ( <i>gcr1 catX CYB2</i> )...	125

3.3.1.1. Скринінг детергентів для виділення ФЦ $b_2$ з клітин дріжджів.....	125
3.3.1.2. Опрацювання афінної хроматографії для очистки ФЦ $b_2$ із клітин <i>O. polymorpha</i> «tr1» .....	130
3.3.1.3. Пошук стабілізуючих компонентів та оптимізація умов зберігання очищених препаратів ФЦ $b_2$ із клітин <i>O. polymorpha</i> «tr1».....	138
3.3.2. Розробка схеми виділення DLDH із клітин <i>O. polymorpha</i> «tr6» ( <i>gcr1 catX cyb2Δ/DLD1</i> ) та очистка ферменту .....	140
3.3.3. Підсумки.....	144
3.4. Створення лабораторних прототипів біореакторів для конверсії рацемату молочної кислоти до оптично чистого L-ізомера та усунення D-лактату з молочнокислих продуктів.....	145
3.4.1. Отримання D-лактату з рацемату шляхом специфічного окислення L-лактату.....	146
3.4.2. Дослідження мікробіологічного розкладу D-лактату з рацемату молочної кислоти.....	149
3.4.3. Створення прототипу біореактора для детоксикації D-лактату.....	152
3.4.4. Підсумки.....	156
3.5. Створення нових ензиматично-спектрофотометричних методів аналізу L- та D-лактату на основі L- та D-лактат:ферицитохром c-оксидоредуктаз рекомбінантних штамів <i>O. polymorpha</i> .....	157
3.5.1. Створення нових ензиматично-фотометричних методів аналізу L-лактату на основі ФЦ $b_2$ <i>O. polymorpha</i> .....	158
3.5.1.1. Розробка нового фотометричного методу аналізу L-лактату на основі ФЦ $b_2$ та «Берлінської блакиті» .....	158
3.5.1.2. Опрацювання протоколів неінвазивного визначення вмісту L-лактату в біологічних рідинах людини ензиматично-фотометричним методом на основі ФЦ $b_2$ та «Берлінської блакиті».....	162



3.5.1.3. Розробка способу повторного використання фермента, імобілізованого на комерційних магнітних мікрочастинках, для ензиматичного визначення L-лактату .....	168
3.5.2. Вивчення можливості використання клітин <i>O. polymorpha</i> «tr6» як джерела дегідрогенази D-лактату для фотометричного аналізу D-лактату в рідинах.....	172
3.5.2.1. Розробка ензиматично-фотометричного аналізу D-лактату на основі утворення формазану як кольорового продукту .....	172
3.5.2.2. Розробка ензиматичного аналізу D-лактату на основі утворення розчинної форми «Берлінської блакиті».....	177
3.5.3. Підсумки.....	182
3.6. Створення амперометричних біосенсорів для аналізу лактату .....	182
3.6.1. Конструювання амперометричних мікробних біосенсорів для визначення L- та D-лактату з використанням рекомбінантних клітин <i>O. polymorpha</i> .....	185
3.6.1.1. Розробка мікробних біосенсорів на L-лактат з використанням пермеабілізованих клітин <i>O. polymorpha</i> «tr1» та електроосадженого полімера .....	185
3.6.1.2. Конструювання безмедіаторного мікробного біосенсора для аналізу L-лактату на основі клітин <i>O. polymorpha</i> «tr1».....	195
3.6.1.3. Конструювання та оптимізація мікробних біосенсорів на D-лактат на основі клітинних уламків <i>O. polymorpha</i> «tr6» і електроосаджуваних полімерів.....	202
3.6.1.4. Конструювання мікробних біосенсорів на D-лактат на основі пермеабілізованих клітин та субклітинних фракцій <i>O. polymorpha</i> «tr6» збагачених мітохондріями і вільно проникаючих медіаторів електронного перенесення .....	213

3.6.2. Конструювання мікробних біосенсорів на L-лактат за використання рекомбінантних клітин <i>O. polymorpha</i> «tr1» і біофункціоналізованих наночастинок золота .....	227
3.6.2.1. Приготування та характеристика наночастинок золота та їх біофункціоналізація для використання в сенсорних технологіях....	227
3.6.2.2. Імобілізація флавоцитохрому $b_2$ на поверхні золотих наночастинок	231
3.6.2.3. Конструювання L-лактат-селективного мікробного біосенсора на основі клітин <i>O. polymorpha</i> «tr1», збагачених ФЦ $b_2$ , іммобілізованим на золотих наночастинках .....	234
3.6.3. Використання очищених препаратів ФЦ $b_2$ для розробки нових методів амперометричного аналізу .....	241
3.6.3.1. Використання ФЦ $b_2$ для візуалізації локальної ензиматичної активності при сканувальній електрохімічній мікроскопії (SECM)....	241
3.6.3.2. Конструювання безмедіаторних ензимних біосенсорів на L-лактат на основі ФЦ $b_2$ та наночастинок золота, іммобілізованих на графітових електродах .....	250
3.6.3.3. Створення прототипу L-лактат-селективного біосенсора “третього покоління” на основі ФЦ $b_2$ , іммобілізованого на поверхні золотого електроду, модифікованого наночастинками золота .....	254
3.6.3.4. Вивчення можливості неінвазійного сенсорного моніторингу вмісту лактату в біологічних рідинах людини за допомогою прототипу лактат-селективного біосенсора “третього покоління” .....	263
Розділ 4 УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	273
ВИСНОВКИ .....	282
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....	286
Додаток 1 .....	318

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АБТС	2,2'-азино-біс-[3-етилбензтіазолін сульфонат-6]
АЛАТ	аланін-амінотрансфераза
АМПД	2-аміно-2-метил-1,3-пропанодіол
АО	алкогольоксидаза
АСМ	атомно-силова мікроскопія
БЕ	безклітинні екстракти
ВРТ	відкрита рамка трансляції
ГДХБС	2-гідроксил-3,5-дихлорбензолсульфонат
ГПТА	глутаматпіруваттрансаміназа
Glc	глюкоза
ГІОН	гліцерол
ДЕ	дріжджовий екстракт
ДЕАЕ	діетиламіноетил
DCFDA	2',7'-дихлорфлуоресцеїн діацетат
DLDH	D-лактат:ферицитохром <i>c</i> -оксидоредуктаза
ДФ	діафораза
ЕДТА	етилендіамінтетраоцтова кислота
EtOH	етанол
СР9	катодний електроосаджуваний полімер
СР-Os	катодний полімер модифікований [Os(bpy) <sub>2</sub> Cl]-комплексом
Lact	лактат натрію
ЛДГ	NAD <sup>+</sup> -залежна лактатдегідрогеназа із м'язів ссавців
ЛО	бактерійна лактатоксидаза
МБТГ	3-метил-2-бензотіазоліонгідрозон
MeOH	метанол
МЧ	мікрочастинки

NAD <sup>+</sup>	нікотинаміддинуклеотид окислений
NADH	нікотинаміддинуклеотид відновлений
NP-40	нонілфеноксиполіетоксилетанол
НТЗС	нітротетразолієвий синій
НТЗХ	нітротетразолій хлорид
НТЗФ	<i>n</i> -йодонітротетразолієвий фіолетовий
НЧ	наночастинки
ПА	питома масова активність
ПААГ	поліакриламідний гель
Pyg	піруват
ПЛР	полімеразна ланцюгова реакція
ПО	пероксидаза хрому
РСМ	рентгеноспектральний аналіз
SDS (ДСН)	додецилсульфат натрію
СБ	середовище Беркгольдера
СЕМ	сканувальна електронна мікроскопія
СЕХМ (SECM)	сканувальна електрохімічна мікроскопія
ТЕМ	трансмісійна електронна мікроскопія
ТХО	трихлороцтова кислота
ФБ	фосфатний буфер
ФМН	флавінмононуклеотид
ФМС	феназинметасульфату
ФМСФ	фенілметансульфонілфторид
ФАД	флавінаденіндинуклеотид
ФЦ <i>b</i> <sub>2</sub>	флавоцитохром <i>b</i> <sub>2</sub>
Cyt <i>c</i>	цитохром <i>c</i>
ЦТАБ	цетилтриметиламоній бромід

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Молочна кислота (лактат) існує у вигляді 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 діагностики 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 [1]. Зміни вмісту лактату також можуть бути наслідком діабету або патологічного всмоктування жирних кислот в товстому кишківнику [2]. У спортивній медицині аналіз L-лактату дозволяє визначити пороговий фізіологічний рівень підготовки спортсмена і підібрати оптимальні режими навантаження.

В організмі людини L-лактат утворюється внаслідок гліколізу та швидко метаболізується до пірувату за дії  $\text{NAD}^+$ -залежної L-лактатдегідрогенази печінки (КФ 1.1.1.27). D-лактат утворюється, як продукт розкладу метилглюксалю (побічного продукту вуглеводневого, ліпідного та білкового обміну). Водночас, у ссавців відсутня D-лактатдегідрогеназа і часткове розщеплення цього енантіомеру, із дуже низькою ефективністю, забезпечується  $\text{NAD}^+$ -залежною D-2-гідроксиацилдегідрогеназою печінки (КФ 1.1.1.345). У нормальному фізіологічному стані L-лактат є переважаючим енантіомером в крові ( $750\text{-}2000 \text{ мкмоль}\cdot\text{л}^{-1}$ ), тоді як вміст D-лактату знаходиться на низькому рівні ( $13\text{-}90 \text{ мкмоль}\cdot\text{л}^{-1}$ ) [3].

D-лактат, як аналіт, став актуальним порівняно недавно. З'ясувалося, що екзогенний D-лактат у підвищеній концентрації ( $\geq 2,5\text{-}3 \text{ ммоль}\cdot\text{л}^{-1}$ ) є токсичним для дітей та дорослих із синдромом короткого кишківника і викликає D-лактатний ацидоз та пов'язані з ним неврологічні дисфункції, що

характеризується атаксією, нечіткою мовою і плутаниною. Патогенез D-лактатного ацидозу в пацієнтів із синдромом короткого кишківника добре досліджено [4, 5]. Короткий тонкий кишківник зумовлює погане всмоктування вуглеводів, що призводить до їх доставки у товстий кишківник, спричиняючи закисленню рН та швидкому розвитку лактобацил, які продукують L- і D-лактат. Бактерійна продукція D-лактату перевищує здатність організму до його метаболізму та екскреції, через що D-молочна кислота накопичується в крові провокуючи розвиток метаболічного D-лактатного ацидозу. Окрім того, деякі лактобацили здатні продукувати D,L-лактат рацемазу - фермент, який додатково спричиняє надлишок D-лактату шляхом перетворення L- в D-лактат [4]. Симптомами прогресування лактатного ацидозу є епізодична сонливість, розвиток галюцинації, ністагму, помутніння зору, офтальмоплегії, дезорієнтації, запаморочення, млявості, надмірної дратівливості та образливої поведінки, які можуть тривати від декількох годин до декількох днів [6]. Окрім того, D-лактатний ацидоз 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). 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 у сироватці крові пов'язане з кетоацидозом, а не гіперглікемією [7]. Припускають, що метаболізм кетонів за участю цитохромів печінки може бути основним джерелом метилглюксалу у хворих цукровим діабетом. У них вдвічі вищий рівень D-лактату порівняно зі здоровими людьми -  $28 \text{ мкмоль}\cdot\text{л}^{-1}$  і  $13 \text{ мкмоль}\cdot\text{л}^{-1}$ , відповідно [8]. У хворих на діабет спостерігається також підвищена активність ферментів, залучених в метаболізмі глюксалу, - альдозоредуктази, глюксалази I і

гліюксалази II [9]. Ускладнення при цукровому діабеті включають ретинопатії [10], нефропатії [11] і нейропатії [12], спричинені продуктами метаболізму метилгліюксалу. Клінічно, D-лактат відіграє важливу роль у формуванні ускладнень у діабетичних пацієнтів [13], 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. Молочнокислі 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 [14]. 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  $\text{NAD}^+$ -залежної лактатдегідрогенази (ЛДГ) або бактерійної лактатоксидази (ЛО) (у випадку визначення L-енантіомеру). Описані методи на основі  $\text{NAD}^+$ -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 ферментів (глутамат-піруваттрансамінази), 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 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 *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 [15]. Це зумовлюється тим, що однією із 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 площа поверхні, можливість перенесення молекул у тканини чи клітини, що захищає їх від біодеградації, та вивільнення впродовж тривалого часу, локальність дії та специфічність взаємодії з біологічними молекулами [16]. При хімічному синтезі НЧ використовують різноманітні варіанти, що відрізняються типом реагента і системи, в якій здійснюється процес [17]. Проста методика синтезу НЧ, а також їх споріднення для зв'язування багатьох біологічних



молекул робить їх привабливими кандидатами для досліджень у сенсорних технологіях. Це дає змогу створення біочастинок (іммобілізованих ферментів на поверхні НЧ та МЧ) із подальшим використанням у біосенсорці, а також в ензиматичних реакціях.

Беручи до уваги актуальність вищезгаданих проблем, основну увагу в нашій дисертаційній роботі було приділено конструюванню продуцентів стабільних форм ФЦ  $b_2$  та DLDH, їх поєднанню із наноносіями та розробка 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 проєктів: INTAS for Young Scientists OPEN CALL 2005 Nr. 05-109-5207 “Construction of flavocytochrome *b*<sub>2</sub>-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 *Halsenua 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 та нанотехнологій для отримання нових селективних біоаналітичних методів і продуктів для 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 надпродуценти та оптимізувати умови синтезу цільових ферментів для сконструйованих рекомбінантних штамів.

2. Опрацювати метод виділення та очищення ФЦ  $b_2$  і DLDH із клітин надпродуцентів *O. polymorpha*. Провести фізико-хімічну і 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 на основі золота *in situ* 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 матеріали, їх структурні та фізико-хімічні властивості.

**Предмет дослідження:** гени *O. polymorpha*, що визначають надпродукцію ФЦ  $b_2$  та DLDH, регуляція синтезу ферментів та створення на їх основі нових біореакторів, ензиматичних та біосенсорних аналітичних підходів визначення вмісту L- та D-лактату.

**Методи досліджень.** У роботі використано різноманітні генетичні, 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 скануючої електронної мікроскопії, рентгеноспектрального аналізу, атомно-силової мікроскопії та трансмісійної електронної мікроскопії. При конструюванні амперометричних біосенсорів використано циклічну вольтамперометрію, імпульсну амперометрію, хроноамперометрію, біосенсорний аналіз, статистичний і кореляційний аналіз.

### **Наукова новизна одержаних результатів.**

Уперше сконструйовано рекомбінантні штами дріжджів *Ogataea 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 штамми. Проведено оптимізацію 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 на модельних сумішах. Уперше розроблено новий ензиматично-фотометричний метод аналізу L-лактату за використання рекомбінантного ФЦ  $b_2$  та «Берлінської блакиті» та опрацьовано

спосіб реутилізації фермента для визначення L-лактату за використання ФЦ  $b_2$ , іммобілізованого на магнітних мікрочастинках. Розроблено 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 елемента 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. Уперше 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 розроблені 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 *Ogataea polymorpha* - продуценти термостабільного ФЦ  $b_2$  і DLDH та отримано очищені ферментні препарати відповідних ферментів, придатні для біоаналітичного використання.

Опрацьовано нові ензиматично-фотометричні методи та відповідні біоаналітичні набори для кількісного 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 протоп біосенсора «третього покоління» на L-лактат.

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

Результати з амперометричних досліджень було використано для створення 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.** Авторів 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. 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 21<sup>st</sup> 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.



# РОЗДІЛ 1

## ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Засвоєння лактату у дріжджів

Молочна кислота – універсальний метаболіт живих організмів, кінцевий продукт утилізації цукрів у молочнокислих бактерій та важливий компонент багатьох харчових продуктів. Деякі види дріжджів володіють здатністю засвоювати молочну кислоту як джерело Карбону та енергії, проте цей процес детально не вивчено. Першим етапом у засвоєнні лактату клітинами дріжджів є транспорт цього субстрату в клітини [18]. Серед дріжджів механізми транспорту молочної кислоти досить різноманітні. *Candida utilis*, *Torulaspora delbruesckii* та *Saccharomyces cerevisiae* здійснюють транспорт лактату завдяки протон-симпортному механізму. Дріжджі *Kluveromyces marxianus* транспортують лактат шляхом уніпорту. *S. cerevisiae* здатні засвоювати коротколанцюгові монокарбонові кислоти як єдине джерело Карбону та енергії в аеробних умовах. Першим етапом у метаболізмі цих субстратів є транспорт через плазматичну мембрану.

Транспорт монокарбонних сполук не спостерігається при рості клітин на середовищі з глюкозою до виснаження цього субстрату. На сьогодні виділено та охарактеризовано мутанти, не здатні до росту на L,D-лактаті. При схрещуванні мутанта з диким штамом, що росте на лактаті, було ідентифіковано, що мутація є рецесивною. Розщеплення за ознакою фенотипу - відсутність росту на лактаті було 2/2 в десяти проаналізованих тетрадах. Це свідчить, що цей фенотип визначається одним геном, локалізованим у хромосомі. Мутантний штам росте на гліцеролі, етанолі, ацетаті, як і штам дикого типу, але не росте у середовищі з піруватом, що свідчить про порушення транспорту монокарбонних кислот у виділеного мутанта.

Ген, мутація в якому спричинює нездатність до росту в середовищі з лактатом, ізолювано й охарактеризовано. Проведено скринінг трансформованих клітин на здатність до росту у середовищі з лактатом. Ген, що кодує лактат-пермеазу, названо *JEN1*. Його відсутність не дозволяє дріжджам ефективно засвоювати лактат. Симпортер Jen1p специфічно індукується лактатом і транспортує в клітини лактат, піруват, ацетат та пропіонат [19, 20]. Профіль експресії гена *JEN1* подібний до профілів генів глюконеогенезу. В його промоторі ідентифіковано послідовність UAS/CSREs (upstream activating sequence/carbon source responsive elements), до якого приєднується дріжджовий транскрипційний активатор Cat8p. При дослідженні експресії гена виявилось, що він репресується Mig1p та Mig2p, і Cat8p потрібен для зняття репресії за небродильних умов росту [21]. Експресія гена контролюється киснем, і за аеробних умов регулюється джерелом Карбону (репресується глюкозою, фруктозою, маннозою та іншими зброджуваними джерелами Карбону) [22]. Зростання експресії *JEN1* може бути спричинене взаємодією Nap2/3/4/5 комплексу з СААТ-боксом у промоторній ділянці гена. Також отримано докази щодо ролі протеїнкінази Snf1p у стимуляції транскрипції гена *JEN1* [22].

Сконструйовано химерний білок Jen1p-GFP – функціональний лактатний транспортер з активністю каталітичного центру  $123 \text{ s}^{-1}$ . Дослідження показали, що Jen1p-GFP надходить у цитоплазматичну мембрану за посередництва Sec6-залежного процесу. За присутності глюкози відбувається його ендоцитоз і переміщення у вакуолі, де білок деградує [23].

Створено гетерологічні системи для експресії монокарбоксилатних транспортерів. Одна з них базується на делеційному мутанті *S. cerevisiae pyk1 mae1 jen1*, який має порушений транспорт монокарбоксилатів та є ауксотрофом за піруватом [24]. Ріст таких дріжджів на середовищі з етанолом та піруватом/лактатом залежить від експресії монокарбоксилатного транспортера.

Ця система була використана для отримання функціональних мембранних білків вищих еукаріот у мікробних системах експресії. Інша гетерологічна система експресії створена для дріжджів *S. cerevisiae/P. pastoris* [25]. Ген *JEN1* субклоновано на інтегративній плазміді, якою трансформовано дріжджі *P. pastoris*. За допомогою Northern- і Western-блотингів підтверджено ефективну експресію лактатпермеази *S. cerevisiae* в клітинах інших дріжджів. Надекспресія гена *JEN1* в клітинах *S. cerevisiae* та *P. pastoris* приводить до посилення транспорту лактату. Створено систему для конститутивної експресії *JEN1* під контролем промотора гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази [25]. Промотор гена *JEN1 S. cerevisiae* використано в ролі сенсора для визначення концентрації низки цукрів, засвоєння яких регулюється глюкозою. Активність промотора *JEN1* індукується за концентрації глюкози нижче 3 г/л і є максимальною при концентрації приблизно 0,1 г/л [20, 26].

Подальше засвоєння лактату у низки дріжджів здійснюється через селективне окислення L- і D-лактату, яке каталізується мітохондріальними ферментами: L-лактат:ферицитохром *c*-оксидоредуктазою (КФ 1.1.2.3; флавоцитохром  $b_2$ , ФЦ  $b_2$ ) і D-лактат:ферицитохром *c*-оксидоредуктазою (КФ 1.1.2.4), відповідно. Ці білки кодуються генами *CYB2* і *DLD1*, відповідно. Для *Kluuveromyces lactis* отримано мутанти по генах D- і L-лактат:ферицитохром *c*-оксидоредуктаз, які не можуть рости на лактаті як єдиному джерелі Карбону [27]. Якщо ж трансформувати ці мутанти бібліотекою генів *K. lactis*, що містить ген *KlCYB2*, то активність відновлюється, і клітини можуть рости на лактаті.

## **1.2. Характеристика L-лактат:ферицитохром *c*-оксидоредуктази (флавоцитохрому $b_2$ , ФЦ $b_2$ ) дріжджів**

Цитохроми - це гемовмісні електронотранспортні білки, які залучені в процес перетворення енергії для продукції АТФ при окисленні метаболітів та

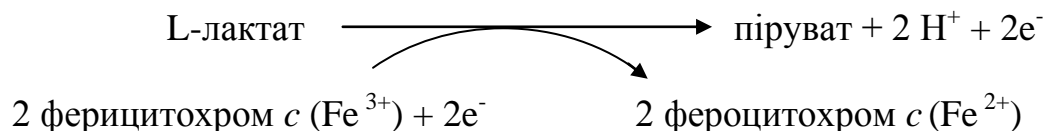
фотосинтезі. Вони виділені із клітин найрізноманітніших таксономічних груп, включаючи бактерії та вищі організми [28]. Усі цитохроми містять протогем IX або його похідні і здатні до оборотної зміни ступеня окислення гемового заліза між +2 і +3. Усі вони мають принаймні 1 гістидиновий залишок, зв'язаний із атомом заліза, тоді як спосіб приєднання і природа шостого ліганда заліза є варіабельною. Редокс-потенціал теж суттєво змінюється серед цитохромів, як і оточення та орієнтація гемових груп.

До початку наших досліджень була відсутня інформація про ФЦ  $b_2$  метилотрофних дріжджів. У той же час, вивчено фізико-хімічні властивості ферменту із пекарських дріжджів *S. cerevisiae* та неконвенційних дріжджів *Hansenula anomala*, для яких відома первинна структура, проведено рентгеноструктурний аналіз, клоновано відповідні гени та отримано рекомбінантні форми білка [29-31]. Для більшості неконвенційних видів дріжджів доступні лише фрагментарні дані по виділенню і характеристиці ФЦ  $b_2$ , описано клонування відповідного гена у *K. lactis* [27, 32, 33]. У зв'язку з цим ми подаємо огляд властивостей ФЦ  $b_2$  пекарських дріжджів та *H. anomala*.

Цитохром  $b_2$  функціонує в клітинах дріжджів як компонент електронотранспортної системи, поєднуючи функції двох різних ферментів – L-лактатдегідрогенази і цитохрому  $b$ . ФЦ  $b_2$  є невід'ємним компонентом дихального ланцюга клітин дріжджів:



Особливістю ферменту є його абсолютна специфічність до стереоконфігурації субстрату як донора електронів і водночас неселективність відносно акцептора електронів (наприклад, ферицитохром  $c$ , фериціанід, метиленовий синій, 2,6-дихлорфеноліндофенол та інші субстрати підтримують L-лактат-оксидоредуктазну реакцію):



Оптимальний рН активності для флавоцитохрому  $b_2$  для лактату і фериціаніду становить 7,0-8,5. Інгібіторами виступають важкі метали, кисень [34, 35], а також гліцерат, оксалат, малат, фторопіруват [36], бромпіруват [37], фенілглюксаль [29], фенілпіруват і жирні кислоти [34, 38].

Молекулярна маса ферменту приблизно дорівнює 235 кДа. Флавоцитохром  $b_2$  є гомотетрамером, кожна субодиниця якого містить по одному поліпептидному ланцюгу, одній молекулі флавінмононуклеотиду і протогему IX (Рис. 1.1) [39-44]. У різних представників дріжджів спостерігається висока гомологія ФЦ  $b_2$ . Особливо висока подібність спостерігається для ділянок, що відповідають флавінмононуклеотид- і протогем IX-вмісним доменам. Ділянка білка із нижчою гомологією відповідає “cap”-ділянці ФЦ  $b_2$ , яка специфічна для кожного виду дріжджів і відповідає за правильну доставку білка, коректне збирання холоферменту ФЦ  $b_2$  та його інтеграцію в місце локалізації.

Залежно від методу виділення, різні автори отримували препарати із значними домішками нуклеотидів. Так, у деяких препаратах флавоцитохрому  $b_2$  був знайдений дезоксирибopolінуклеотид, який містить 15 нуклеотидів на групу гему. Цей полінуклеотид можна відділити електрофоретично від білку, при цьому останній не втрачає каталітичну активність і не змінює свої спектральні властивості у відповідній ділянці спектру [34, 35].

У присутності сечовини або хлоргідрату гуанідину білок дисоціює на фрагменти масою 17 та 34 кДа [35]. Субодиниця ФЦ  $b_2$  укладена двома ковалентно з'єднаними доменами, що виконують різні функції: L-лактатдегідрогеназний та цитохром  $c$ -редуктазний. Структурний аналіз

L-лактатдегідрогеназного домену (Mr 39 кДа) показав, що він містить ФМН і не має гему. Цей домен володіє 70 % від фериціанідоксидоредуктазної активності холоферменту, але він повністю позбавлений цитохром *c*-оксидоредуктазної активності [43, 30, 44].

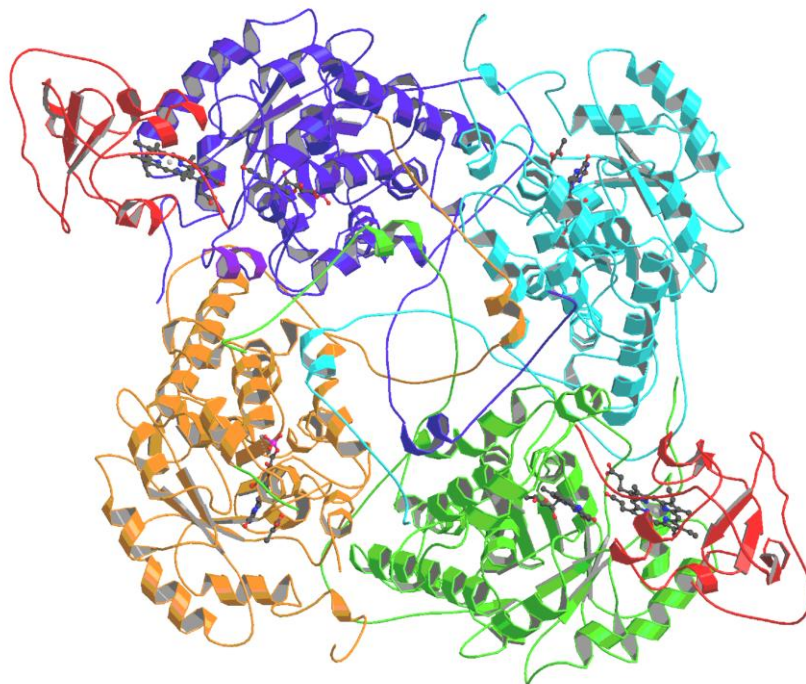


Рис. 1.1. Холоензим флавоцитохрому  $b_2$  *S. cerevisiae* [45]

Залежно від умов, фермент може знаходитись в окисленій та відновленій (активній) формі. Із 10 залишків цистеїну, що припадають на одну групу гему, в окисленій формі білка 5 залишків можуть титруватись *n*-хлормеркурибензоатом, а у відновленій формі титруються 6 SH-груп. В результаті реакції утворюється модифікований білок, який повільно інактивується і відщеплює ФМН. Ці процеси зв'язані з конформаційними змінами білка [35].

ФМН можна відділити від білка, обробивши ФЦ  $b_2$  сульфатом амонію в кислому розчині. Звільнений таким чином від флавіну препарат має спектр, подібний на спектр флавоцитохрому  $b_2$ , але в ньому відсутні смуги флавінової частини. Додавання ФМН відновлює ферментативну активність препарату, причому, коли в ролі акцептора електронів використовували цитохром *c*, ця

активність була вища, ніж у випадку, коли роль акцептора виконує фериціанід. На основі цього було зроблено висновок, що взаємозв'язок реконструйованого ферменту з цитохромом *c* сприяє його стабілізації [46-48].

На сьогодні мало що відомо про конкретні механізми різних стадій перенесення електрона від ФМН до гему, проте останнім часом вони активно вивчаються з використанням сучасних методів: флуорисцентного, ЯМР, ПМР і радіоізотопного аналізу.

Перенесення електрона в каталітичному циклі ФЦ  $b_2$  відбувається в напрямку від L-лактату через флавін до гему з подальшим його відновленням в декілька стадій (рис. 1.2) [47, 49, 50]: 1) окислення лактату до пірувату, з наступним відновленням ФМН; 2) перенесення одного електрона від повністю відновленого ФМН до гему, внаслідок чого утворюється семіхінонна форма ФМН і відновлюється гем; 3) відновлення першої молекули цитохрому *c* при перенесенні електрона з гемової групи ФЦ  $b_2$ ; 4) перенесення другого електрона від семіхінонної форми ФМН до гему, як наслідок, повне окислення ФМН і відновлення гему; 5) відновлення наступної молекули цитохрому *c* електроном, перенесеним від гему, з наступним повним окисленням ферменту, після чого ФЦ  $b_2$  знову готовий повторно розпочати каталітичний цикл.

Хоча в перенесенні електронів на цитохром *c*, без сумніву, гем бере участь, проте в реакції з фериціанідом (як акцептором електронів) електрон переноситься по обхідному шляху без участі гему.



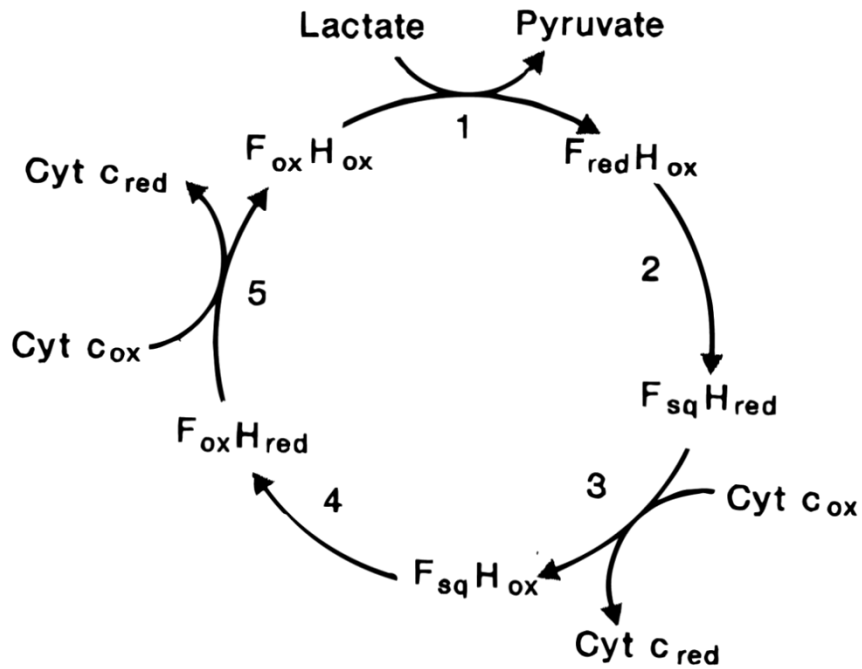


Рис. 1.2. Каталітичний цикл ФЦ  $b_2$  [51]

**F** – ФМН; **H** – гем; **F<sub>sq</sub>** – семіхінонна форма ФМН

### 1.3. Характеристика D-лактат:ферицитохром *c*-оксидоредуктази (DLDH) дріжджів

D-лактат:ферицитохром *c*-оксидоредуктаза (DLDH) досі є добре охарактеризована лише для декількох видів дріжджів. Це мембранний інтегральний білок мітохондрій, який, як кофактори реакції переносу електронів, використовує ФАД та  $Zn^{2+}$  [52]. DLDH характеризується електропозитивним поверхневим потенціалом за рахунок переваги в його білковій структурі основних амінокислот над кислими. Позитивний заряд фермента сприяє взаємодії DLDH з негативно зарядженими фосфатними групами фосфоліпідної мембрани і ця електростатична взаємодія, ймовірно, додатково стабілізує орієнтацію білка у внутрішній мембрані мітохондрій (Рис. 1.3.).



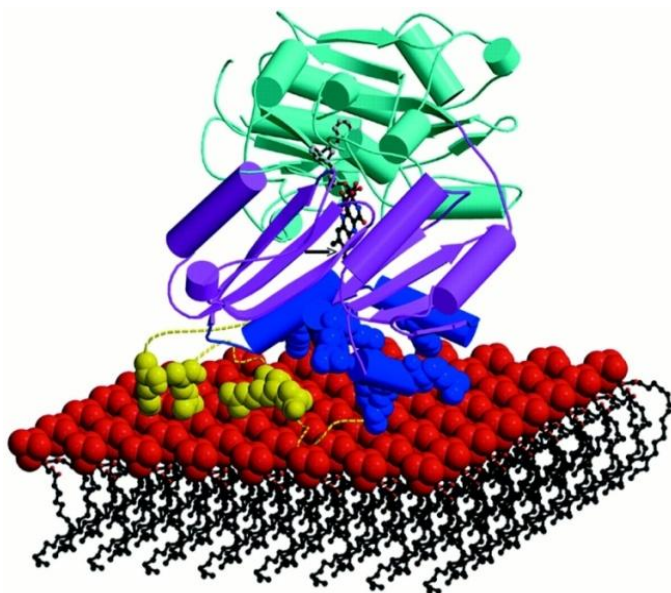


Рис. 1.3. Холоензим DLDH *S. cerevisiae* [53].

DLDH – це гомодимерний білок характерного жовтого кольору (за рахунок нековалентно зв'язаного кофактора ФАД) з молекулярною масою субодиниці 63 кДа у *Kluveromyces lactis* і 64 кДа в *S. cerevisiae* [54, 55].

Кінетичні характеристики DLDH досліджено за допомогою спектроскопії методом зупиненого потоку. Відновлення DLDH субстратом (D-лактатом) відбувається двостадійно. Швидка стадія з максимальною швидкістю  $400 \text{ s}^{-1}$  являє собою швидке формування фермент-субстратного комплексу і формування рівноваги між окисленим та відновленим фермент-субстратним комплексом. Повільна стадія, яка протікає зі швидкістю близько  $0,36 \text{ s}^{-1}$ , є наслідком повільного вивільнення продукту (пірувату) із відновленого ферменту [56]. DLDH проявляє яскраво виражену субстратну специфічність до D-лактату із значенням константи Міхаеліса-Ментен ( $K_M$ ) - 0,285 мМ. Водночас, субстратом може виступати і D- $\alpha$ -гідроксибутират, проте,  $K_M$ -значення фермента до нього є суттєво вищим – 10 мМ. Окрім функції окислення D-лактату, *in vivo* DLDH забезпечує перенесення електронів на цитохром *c* у дихальному ланцюзі, дане твердження було вперше підтверджене на основі аналізу *in vitro* [57].

Хоча пряме реокислення ферменту киснем не має суттєвого впливу при каталітичному аналізі, DLDH здатен до помітного автоокислення, що підтверджується набуттям типового жовтого забарвлення, характерного для окисленої форми фермента. Специфічність ферменту до акцептора електронів є також досить яскраво вираженою. Найвищу здатність до відновлення DLDH проявляють феназинметасульфат (ФМС) та цитохром *c*. Цікавим фактом є те, що цитохром *c* із серця коня, бика чи тунця проявляють суттєво вищу DLDH-відновлюючу активність у порівнянні з дріжджовим цитохромом *c*.

pH оптимум DLDH дуже залежить від природи буферної системи та її іонної сили. pH оптимум фермента в Тріс-буфері відповідає значенню 8, в імідазоловому буфері – 7,5, а у фосфатному – 7,0. Фермент витримує значне зниження значення pH без інактивації (30 с при pH 3,0), проте, навіть нетривале підвищення значення pH вище 8,0, призводить до швидкої його інактивації. Окрім того, показано, що відновлення флавопротеїну циклохромом *c* конкурентно гальмується високою іонною силою буферної системи, і це явище є значно більш вираженим у полівалентних буферах в порівнянні із моновалентними.

На активність DLDH не впливає присутність SH-вмісних реагентів чи субстратних аналогів (L-лактату, пірувату, L-малату). Окрім того, фермент не чутливий до дії пероксиду водню і лишень похідні ртуті проявляють яскраво виражений інгібуючий ефект. Дещо нижчий інгібуючий вплив на активність ферменту мають такі хелатуючі агенти, як оксалат та ЕДТА. За швидкістю впливу на  $Zn^{2+}$  у складі DLDH хелатори металів можна поділити на два типи: хелатори швидкої дії (швидко зв'язують  $Zn^{2+}$  зі швидким інактивуючим впливом на фермент) - це оксалат та ЕДТА; хелатори повільної дії - *o*-фенантролін. Інгібування DLDH *o*-фенантроліном є результатом утворення змішаного комплексу типу фермент-цинк-*o*-фенантролін, а не видалення металу.

Хелаторний комплекс можна дисоціювати за допомогою діалізу або конкурентного зв'язування з двовалентними металами, тоді активність фермента повністю регенерується. Тобто, інгібуюча дія хелатора відбувається не шляхом від'єднання металевого компонента (руйнування холоферменту) [58]. Загалом, зв'язок цинку в молекулі DLDH є більш стабільним, у порівнянні зі з'єднанням ФАД-білок, що формується двома субдоменами ФАД-зв'язуючого домену, розміщуючи кофактор між ними. ФАД утримується білком за рахунок утворення водневих зв'язків і ван-дер-ваальсовими взаємодіями [53]. ФАД легко вивільняється з білка при дії на фермент 5 % трихлороцтової кислоти або 2 % перхлоратної кислоти. У нативній формі холоферменту ФАД не здатен до флуоресценції.

#### **1.4. Генетична регуляція синтезу флавоцитохрому $b_2$ у дріжджів**

Генетична регуляція утилізації лактату у дріжджів вивчена недостатньо, а наявна інформація стосується, в основному, пекарських дріжджів. Слід відзначити, що регуляція синтезу ФЦ  $b_2$  вважається зручною моделлю при вивченні регуляції біогенезу мітохондрій, який залежить від координованої експресії генів ядерної та мітохондріальної локалізації, векторним топогенезом окремих поліпептидів та регульованим збиранням мультикомпонентних білкових комплексів.

У *S. cerevisiae* ФЦ  $b_2$  локалізований в мітохондріях, у міжмембранному просторі, і кодується геном *CYB2*. ФЦ  $b_2$  синтезується в цитозолі і після обмеженого протеолізу транспортується в міжмембранний простір мітохондрій. В гаплоїдному наборі геному дріжджів є лише одна копія гена *CYB2*.

Експресія ядерного гена *CYB2* *S. cerevisiae* є об'єктом строгого метаболічного контролю на транскрипційному рівні. При цьому мають місце феномени: а) репресії синтезу фермента глюкозою при бродінні; б)

дерепресії/індукції при рості клітин на незброджувальних субстратах – етанолі, гліцеролі; в) індукції безпосереднім субстратом ФЦ  $b_2$  – L-лактатом; г) пригнічення експресії за анаеробних умов або у відповідь на дефект синтезу гему [59].

При рості пекарських дріжджів за аеробних умов утворюються дві різні лактат цитохром *c*-редуктази, одна специфічна до L(+)-лактату, а інша специфічна до D(-)-лактату. Жоден із цих двох ферментів не синтезується при рості дріжджів за анаеробних умов. Вплив умов аерації на активність D(-)- і L(+)-лактат цитохром *c*-редуктаз в культурах дріжджів подібний. Синтез D-лактат цитохром *c*-редуктази наростає значно швидше, ніж L-лактат:цитохром *c*-редуктази. Проте, після лаг-періоду вміст L(+)-лактат:цитохром *c*-редуктази вдвічі перевищує рівень D(-)-лактат:цитохром *c*-редуктази.

Важлива роль у регуляції біосинтезу ФЦ  $b_2$  належить гему. Як відомо, гем відіграє роль специфічного месенджера у  $O_2$ -сенсорних глобальних системах передачі регуляторних сигналів. Гем-залежна регуляція опосередкована активаторним фактором Nar1p, транскрипційна активність якого регулюється безпосередньо через зв'язування з гемом як кофактором. Nar1p – головний транскрипційний фактор, залучений у позитивну регуляцію транскрипції *CYB2*, яка опосередковується взаємодією регуляторного білка з двома зв'язуючими сайтами промотора гена флавоцитохрому  $b_2$ . Nar1p, вірогідно, зв'язується з двома протилежно орієнтованими регуляторними ділянками промотора гена ФЦ  $b_2$ : *UASIA* (-243/-218) і *UASIB* (-443/-418). Схематична модель регуляції експресії гена *CYB2* у пекарських дріжджів наведена на Рис. 1.4.

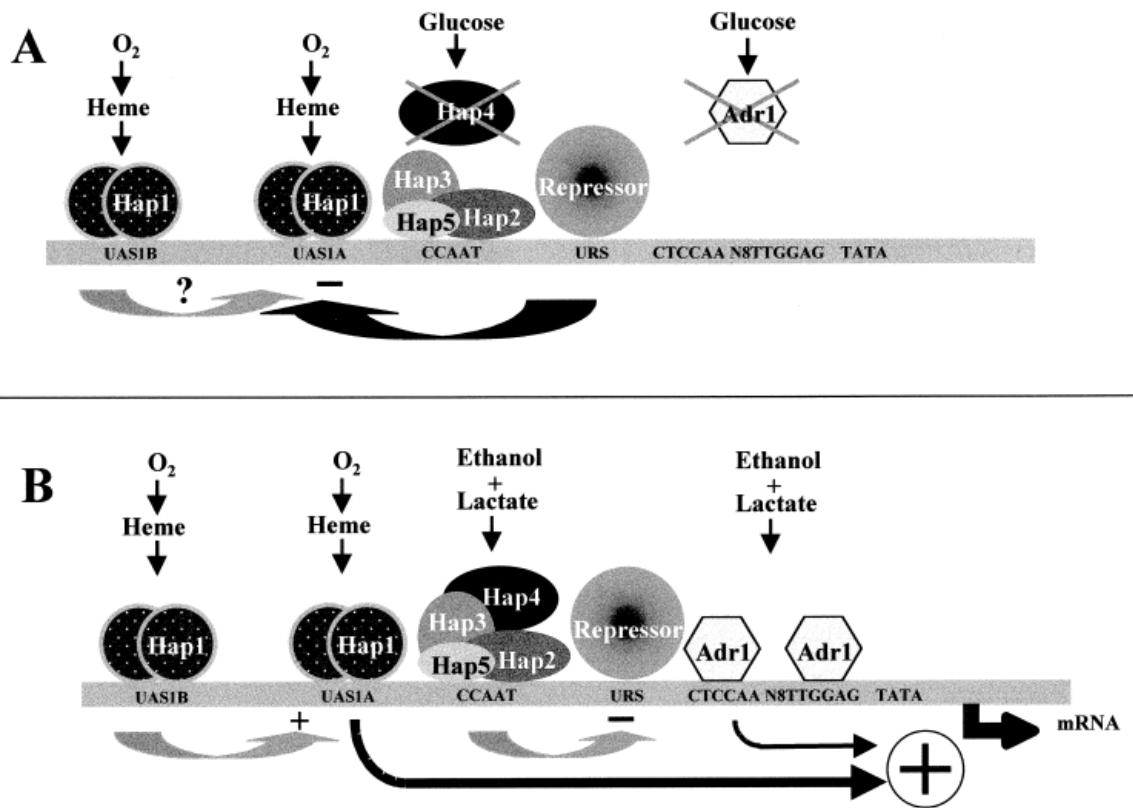


Рис. 1.4. Схематична модель регуляції експресії гена *CYB2* транскрипційними факторами Hap1p, Hap2/3/4/5p і Adr1p [60]. (А) - глюкозна репресія. (В) - дерепресія при рості на суміші етанолу з лактатом.

Експресія *CYB2* повністю пригнічується при утилізації глюкози, причому незалежно від доступності кисню. ФЦ *b<sub>2</sub>* не синтезується і при рості пекарських дріжджів на галактозі та рафінозі. Отримано низку мутантів із порушеною глюкозною катаболітною репресією гена *CYB2*. Показано, що у делеційного мутанта *hvk2Δ* з інактивованим геном загального регулятора глюкозної репресії – гексокінази II – знімається репресія синтезу ФЦ *b<sub>2</sub>* глюкозою. Проте, найвірогідніше, регуляція гена *CYB2* джерелами Карбону здійснюється множинними механізмами, у тому числі, із залученням комплексу Hap2/3/4/5p, який знімає негативний вплив на транскрипцію гена *CYB2* гіпотетичного репресора, зв'язаного з *URS1*-елементом.

Як і для інших мітохондріальних імпортованих білків, для “звільнення” від глюкозної репресії синтезу ФЦ  $b_2$  необхідний повний гетеромерний комплекс  $\text{Har2/3/4/5p}$ . На рівні мРНК і білка показано, що делеція гена *HAR2* призводить до порушення експресії ФЦ  $b_2$ .

Делеційний аналіз промотора гена *CYB2* показав, що більшість цис-регуляторних елементів зосереджена між позиціями  $-446/-90$ . Сайт ініціації транскрипції гена *CYB2* знаходиться в положенні  $-44/-34$  відносно АТG-кодону. Експерименти по трансформації клітин дріжджів плазмідами, що містять ген  $\beta$ -галактозидази під контролем різних варіантів вкорочених промоторів гена *CYB2*, з наступним аналізом  $\beta$ -галактозидазної активності трансформантів показали, що репортерна активність суттєво залежить від мутацій по генах *HAP1*, *HAP2*, *HAP3* та *HAP4* клітин господаря і характеру делеції в аналізованому промоторі.

Аналіз нуклеотидної послідовності промоторної ділянки гена *CYB2* виявив пентануклеотид ССААТ ( $-187/-183$ ), відомий як серцевинний елемент сайтів зв'язування промоторних ділянок низки генів із комплексом  $\text{Har2/3/4/5p}$ . Делеція фрагменту  $-200/-137$  різко підвищує експресію  $\beta$ -галактозидази у гібридній конструкції, введеної в клітини дикого типу, але не мутанта *hap1*. Більш коротка делеція в області  $-170/-137$  не порушує залежності  $\beta$ -галактозидазної активності від присутності в клітинах білка  $\text{Har1p}$ , але повністю знімає залежність експресії репортерного гена від присутності чи відсутності гетерокомплексу  $\text{Har2/3/4/5p}$  (активність  $\beta$ -галактозидази у мутантів *hap2*, *hap3* і *hap4* майже така ж висока, як у клітин дикого типу при рості за умов дерепресії). Це свідчить на користь концепції, згідно з якою комплекс  $\text{Har2/3/4/5p}$  не є безпосереднім транскрипційним активатором гена *CYB2*, а знімає дію гіпотетичного репресора, який зв'язується із цис-елементом негативного типу дії, розміщеним у районі  $-70/-137$ . Білок  $\text{Har4p}$ , вірогідно, є лімітуючою ланкою в утворенні активуючого

комплексу  $\text{Nap2/3/4/5p}$ , і пригнічення експресії гена  $\text{CYB2}$  високими концентраціями глюкози пояснюють низьким рівнем синтезу  $\text{Nap4p}$ . За умов штучної надекспресії цього білка під контролем сильного конститутивного промотора репресуючий вплив глюкози на синтез ФЦ  $b_2$  у клітин дикого типу суттєво знижується. Оскільки цього не відбувається у мутанта  $\text{hap1}$ , було зроблено висновок, що для оптимального функціонування комплексу  $\text{Nap2/3/4/5p}$  необхідний також білок  $\text{Nap1p}$ . Механізм такого синергізму невідомий.

Аналіз нуклеотидної послідовності в позиції  $-137/-112$  регуляторної області гена  $\text{CYB2}$  виявив мотиви, дуже подібні до сайту зв'язування регуляторного білка  $\text{Adr1p}$ , який залучений у дерепресію глюкозо-репресибельного гена  $\text{ADH2}$  і який координує контроль транскрипції різних генів джерелами Карбону у пекарських дріжджів. На підставі низки експериментальних даних (зменшення електрофоретичної рухомості відповідного фрагменту ДНК у присутності інтактного білка  $\text{Adr1p}$ , але не його мутантної форми; 1000-кратна стимуляція  $\beta$ -галактозидази, злитої із промотором гена  $\text{CYB2}$ , при штучній надекспресії білка  $\text{Adr1p}$ ) зроблено висновок, що транскрипційний активатор  $\text{Adr1p}$  є теж необхідним для транскрипційної регуляції гена  $\text{CYB2}$ .  $\text{Adr1p}$ -зв'язуючий сайт гена  $\text{CYB2}$  локалізований на 8 п.н. вище ТАТА-елементу і складається із двох субсайтів у протилежній орієнтації, відокремлених спейсером з 8 п.н. За умов росту клітин на 5 % глюкозі має місце репресія синтезу білка  $\text{Adr1p}$ , що негативно відбивається на рівні експресії гена  $\text{CYB2}$ . Механізм активаторної ролі транскрипційного фактора  $\text{Adr1p}$  невідомий, проте висловлено припущення про вплив його на перебудову хроматину [60].

### **1.5. Генетична регуляція синтезу D-лактат:ферицитохром c-оксидоредуктаз у дріжджів**

Генетична регуляція гена  $\text{DLDI}$ , що відповідає за синтез

D-лактат:ферицитохром *c*-оксидоредуктази, найширше описана для дріжджів *K. lactis* та *S. cerevisiae*. У *K. lactis* експресія *KIDL* регулюється на транскрипційному рівні двома механізмами: індукується лактатом і репресується глюкозою. Водночас, глюкозна катаболітна репресія у *K. lactis*, на противагу *S. cerevisiae*, не впливає на дихання дріжджів, яке відбувається незалежно від природи джерела Карбону [54].

У дріжджів *S. cerevisiae* регуляція гена *DLD1* є аналогічною до регуляції експресії гена *CYB2*. У дерепресії генів, які кодують мітохондріальні функції відповіді на перехід від бродильного до окисного метаболізму, основну роль відіграє комплекс Hap2/3/4/5. Дерепресію *DLD1*, після переходу із глюкози на лактат, досліджували на диких та ізогенних мутантних штаммах *hap2*, *hap3* і *hap4*. Кінетика дерепресії свідчить про те, що в штамі дикого типу ген *DLD1* дерепресується на 5 годину після заміни субстрату. Водночас, у мутантних штаммах не спостерігалась дерепресія *DLD1* за аналогічних умов. Це свідчить про те, що для регуляції *DLD1* необхідні продукти генів *HAP2*, *HAP3* і *HAP4*.

Вивчення 5'-фланкуючої послідовності *DLD1* показало, що ДНК-елементи необхідні для експресії гена *DLD1*, розташовані вище кодуєної області -296/-165. Ця область включає в себе пентануклеотид ССААТ - елемент сайту зв'язування промоторної ділянки гена із комплексом Hap2/3/4/5p. Аналіз мутацій в цьому елементі демонструє те, що цілісність касети ССААТ, розташованої на відстані -199, необхідна для дерепресії *DLD1* на неферментативних субстратах, і що цей район, ймовірно, є сайтом зв'язування для комплексу HAP2 в промоторі *DLD1*. Водночас, *DLD1* у *S. cerevisiae* регулюється не тільки природою джерела Карбону, а також наявністю кисню. За анаеробних умов активність DLDH не проявляється. У дріжджів кисень-залежна експресія більшості генів також регулюється і гемом [61]. Мутація *hem1*, що перешкоджає біосинтезу гема, викликає різке зниження транскрипції *DLD1*. Таким чином, *DLD1* можна



віднести до класу генів, що на рівні транскрипції активуються гемом. Припускається, що молекула гема відіграє ключову роль у чутливості та трансдукції кисневого сигналу, діючи як коефектор для факторів транскрипції низки генів, що беруть участь у контролі дихальної активності. Продукт гена *HAP1* вважається основним гем-чутливим транскрипційним регулятором у дріжджів. Аналіз мутантів *hap1* і *hem1* демонструє, що втрата гема суттєво сильніше впливає на рівень експресії *DLD1*, ніж втрата *Hap1p*. Це підтверджує, що і інші гем-залежні транскрипційні фактори, такі як активатор синтезу гема *HAP2*, можуть також бути залучені в його активації. *Hap1p* і *Hap2p* демонструють адитивний ефект на активацію експресії *DLD1*, оскільки поєднання мутацій *hap1 hap2* у двох генах викликає більш помітне зниження м-РНК *DLD1*, ніж мутації по окремих генах. Це підтверджує гіпотезу, що гемовий ефект може бути опосередкований *Hap1p* і *Hap2p*. *Hap1p* є членом родини білків цинкового кластера яка включає *Gal4p*, *Ppr1p* і *Put3p*. Ці білки специфічно зв'язуються з ДНК як гомодимери через цинк-кластерний домен CGG. *Hap1p* взаємодіє із промотором *DLD1* через *Hap1p*-зв'язуючий елемент – триплет CGG. Цей триплет знаходиться межах кодуючої послідовності -276/-274 і є критичним для зв'язування *Hap1p* [62].

Для *K. lactis* транскрипційні регуляторні процеси було проаналізовано на моделі, в якій рівень експресії гена *LacZ* контролювався промотором гена *KLDDL*, що в свою чергу залежить від продуктів генів *FOG1* і *FOG2*, які беруть участь в глюкозній дерепресії. Було показано, що для мутантів *fog1* і *fog2*, ріст на лактаті сильно знижений [63]. При аналізі транскрипції гена *KIDL* у відповідних мутантах (*fog1* і *fog2*) було продемонстровано, що білкові продукти генів *FOG1* і *FOG2* є позитивними регуляторами *KIDL* на транскрипційному рівні, оскільки в обох мутантів рівні відповідних м-РНК були сильно зниженими.

Для виявлення цис-активних елементів промотора *KIDLD* використовувався репортерний ген  $\beta$ -галактозидази, злитий з промотором гена *KIDLD*. Таким чином, у промоторі *KIDLD* було виявлено два основні регуляторні регіони, один, який залучений до індукції, а інший - до глюкозної репресії. Останній регіон розташований в межах -551/ -471 регуляторної області. У клітинах, вирощених на глюкозі, делеція у районі до -471 призводить до п'ятикратного збільшення рівня  $\beta$ -галактозидази порівняно до рівня, характерного для клітин, що містять повний промотор. Аналіз цього регіону не виявив жодних відомих регуляторних послідовностей. Однак, в промоторі гена *KIDLD* у межах -546/-521 було знайдено прямий повтор, хоча і не було продемонстровано, що цей повтор є мішенню для регуляторних білків. Регуляторна область промотора *KIDLD* -471/-235 має специфічну роль в індукції субстратом. Так, видалення даної ділянки викликає падіння рівня експресії ферменту в клітинах, вирощених у присутності лактату, але не в клітинах, вирощених на глюкозі [64].

Окрім того, *KIDLD* регулюється продуктом гена *KIHAP2*, який є гомологічним гену *HAP2* в *S. cerevisiae*. Ген *KIHAP2* необхідний для лактатної індукції синтезу *KIDLD*-мРНК і, відповідно, для росту клітин на цьому джерелі Карбону [65]. У *S. cerevisiae*, продукт *HAP2p* можна вважати загальним фактором регуляції енергетичного обміну. На відміну від *S. cerevisiae*, у *K. lactis* продукт гена *KIHAP2* регулює значно меншу кількість функцій, і утилізація лактату є однією з них. Це може відображати різні типи регуляції енергетичного обміну у двох видів дріжджів. У *K. lactis*, на відміну від *S. cerevisiae*, задіяні в диханні ферменти не піддаються глюкозній репресії, тому дихальна активність і пов'язане з нею окисне фосфорилування є завжди активні, незалежно від джерела Карбону.

## 1.6. Генетична регуляція засвоєння лактату дріжджами при підвищеній температурі

Показано, що засвоєння L-лактату дріжджами при підвищеній температурі залежить від гена *CPR3*, що кодує білок циклофілін. Циклофіліни – це родина еукаріотичних білків, вперше ідентифікованих за їх високою афінністю до циклоспорину А (ЦсА). Фізіологічна роль циклофілінів невідома. *In vitro* циклофіліни володіють пептидилпроліл-цис-транс-ізомеразною активністю (ППІ), а, отже, можуть відповідати за збирання білків *in vivo*. Ізольовано циклоспориновий ген *CPR3* дріжджів, який, гіпотетично, кодує мітохондріальну ізоформу білка. Відомі також циклофілінові гени *CPR1*, *CPR2* та ген *FPR1*, що кодує FK506-зв'язуючий білок із ППІазною активністю.

Описано мутанти з пошкодженими генами *CPR1*, *CPR2*, *CPR3* та *FPR1*. Усі мутанти вирощувались за різних умов на середовищі YPD, що містило як єдине джерело Карбону: глюкозу, галактозу, гліцерол, піруват та лактат. Чашки інкубувались при 30 °C та 37 °C. Усі мутанти росли на всіх джерелах Карбону при 30 °C, проте мутанти *cpr3* були нездатні до росту на L-лактаті при 37 °C. При цій же температурі на середовищі з піруватом ріст *cpr3*-мутантів був також дещо пригніченим. Мутанти з пошкодженими генами *CPR1*, *CPR2* та *FPR1* нормально росли при 37 °C. При відновленні *CPR3*-генотипу, відновлювалась і здатність дріжджів рости на L-лактаті та піруваті при 37 °C.

Для дріжджів *S. cerevisiae* відомий лише єдиний шлях метаболізму лактату – його окислення флавоцитохромом  $b_2$  в інтермембранному просторі мітохондрій до пірувату. Оскільки, ріст *cpr3*-мутантів дещо пригнічується піруватом при 37 °C і зовсім припиняється на L-лактаті при 37 °C, то це свідчить, що продукт гена *CPR3* може бути задіяний в метаболізмі лактату на стадії, що передує окисленню лактату до пірувату, зокрема, транспорту в міжмембранний простір мітохондрій. Однак, здатність *cpr3*-мутантів рости на гліцеролі та піруваті свідчить про те, що

продукт гена *CPR3* не є суттєвим для нормального функціонування мітохондрій дріжджів. Для того, щоб з'ясувати, чи не впливає продукт гена *CPR3* на індукцію синтезу гена *CYB2* (що кодує ФЦ  $b_2$ ) чи його стабільність, було проаналізовано індукцію синтезу *CYB2*-мРНК дикого та мутантного штамів. Обидва штами продукували стабільну мРНК гена *CYB2*, що свідчить про відсутність впливу продукту гена *CPR3* на індукцію синтезу *CYB2* чи стабільність білка. Оскільки продукт гена *CPR3* безпосередньо не впливає на *CYB2*, залишається єдино можливим припущення, що процеси, пов'язані із функцією *CPR3*, - це дозрівання чи посттрансляційна стабілізація ФЦ  $b_2$ . Найвірогідніше, роль продукту гена *CPR3* дріжджів полягає в участі в складанні або конформаційних змінах флавоцитохрому  $b_2$  при транспортуванні попередника ферменту в міжмембранний простір мітохондрій [66].

Таким чином, на сьогодні ідентифіковано чотири гени, залучені в метаболізм лактату у пекарських дріжджів. Їх перелік наведено в Табл. 1.1.

Табл. 1.1

Гени, залучені в метаболізм L- і D-лактату у пекарських дріжджів

Ген	Білковий продукт	Фенотип мутації по гену
<i>JEN1</i>	Лактатний транспортер	Нездатність рости на рацематі (L,D-лактаті)
<i>CYB2</i>	ФЦ $b_2$	Нездатність рости на L-лактаті
<i>DLD1</i>	DLDH	Нездатність рости на рацематі (L,D-лактаті) подвійного мутанта <i>cyb2Δ dldΔ</i>
<i>CPR3</i>	Пептидил-проліл-цис-транс-ізомераза (ротамаза, циклофілін-3, циклоспорин-чутлива пролін-ротамаза-3)	За пермісивних умов (30 °C) мутант життєздатний, але нездатний рости на L-лактаті при 37 °C

## **1.7. Лактат-селективні ферменти як біоаналітичний інструмент при визначенні вмісту L- і D-лактату**

Молочна кислота існує у формі двох (L- і D-) стереоізомерів. І хоча L-ізомер є основним метаболітом у природі, деякі види молочнокислих бактерій продукують D-молочну кислоту, яка повільніше, але засвоюється дорослим організмом, проте у дітей, як компонент неякісних йогуртів, може викликати харчове отруєння. В літературі описано унікальну форму D-лактатного ацидозу при деяких захворюваннях кишківника, яка викликається надмірним ростом в кишківнику аномальної мікрофлори, здатної продукувати D-лактат. Симптомами прогресування лактатного ацидозу є епізодична сонливість, розвиток галюцинації, ністагму, помутніння зору, офтальмоплегії, дезорієнтації, запаморочення, млявості, надмірної дратівливості та образливої поведінки, які можуть тривати від декількох годин до декількох днів [6]. Окрім того, D-лактатний ацидоз погіршує стан хворих на енцефалопатію.

D-лактат розглядається як потенційний маркер тяжкості цукрового діабету, оскільки він накопичується в сироватці крові внаслідок посилення шунтового шляху метаболізму тріозофосфатів до метилгліюксалу та відновлення останнього до D-молочної кислоти [67]. Встановлено, що підвищення вмісту D-лактату у сироватці крові пов'язане з кетоацидозом, а не гіперглікемією [7]. Припускають, що метаболізм кетонів за участю цитохромів печінки може бути основним джерелом метилгліюксалу у хворих цукровим діабетом. У них вдвічі вищий рівень D-лактату порівняно зі здоровими людьми [8]. У хворих на діабет спостерігається також підвищена активність ферментів, залучених в метаболізмі гліюксалу, - альдозоредуктази, гліюксалази I і гліюксалази II [9, 68]. Ускладнення при цукровому діабеті включають ретинопатії [10], нефропатії [11] і нейропатії [12], які спричинені метилгліюксалем та продуктами його метаболізму.

За рівнем L-лактату в крові діагностують гіпоксію, ацидоз [69, 70], деякі гострі серцево-судинні захворювання, рівень токсичності ліків [71]. Тестування цього метаболіту в крові спортсменів використовують для моніторингу фізичного навантаження з метою забезпечення оптимальних тренувальних режимів [72].

Важливість визначення вмісту лактату не лімітується лише медичним сектором. Лактат є компонентом багатьох харчових продуктів і напоїв. Молочнокислі 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 [14]. Якість молока, пива, вина, фруктових і овочевих соків можна оцінити, визначаючи вміст L- і D-лактату.

Основна увага в біоаналітичній практиці звертається на L-лактат, оскільки він є природним метаболітом, а також тому, що більшість доступних ферментів, що використовуються в ензиматичному аналізі лактату, “розпізнають” одночасно обидва стереоізмери. Для аналізу лактату широко використовують фізико-хімічні, хімічні (залізоамонійний галун та ін.) [73] та ензиматичні підходи [74, 75]. Більшість із хімічних методів аналізу лактату не є селективними і потребують значних затрат часу і підготовчих лабораторних процедур (зокрема, включають фільтрацію, хроматографію, депротейнізацію зразків, кип'ятіння і т.п.).

Ензиматичні та біосенсорні методи аналізу лактату найчастіше базуються на використанні  $\text{NAD}^+$ -залежної лактатдегідрогенази (ЛДГ) із скелетних м'язів або серця ссавців (КФ 1.1.1.27) [76-78], бактерійної лактатоксидази (ЛО) (КФ 1.13.12.4) [79- 81] або біензимної системи - пероксидази (ПО) і ЛО [82-84]. Ці методи аналізу базуються на ензиматичному окисленні лактату до пірувату

ферментом ЛДГ із наступним спектрофотометричним визначенням NADH [74; 85] або колориметричним моніторингом пероксидазного [86] або безпероксидазного окислення хромогену, із використанням ЛО, з утворенням забарвленого продукту [75].

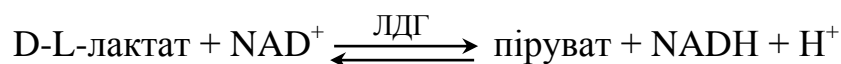
На основі препаратів ЛДГ і ЛО розроблено комерційні ензиматичні набори [87, 88] та біосенсори [89, 90] для визначення вмісту лактату.

### **1.7.1. Ензиматичні методи визначення вмісту молочної кислоти**

#### **1.7.1.1. Методи аналізу лактату на основі NAD<sup>+</sup>-залежної лактатдегідрогенази із м'язів ссавців**

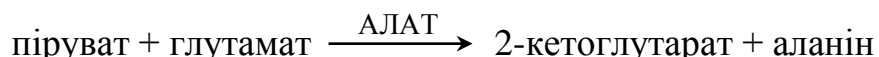
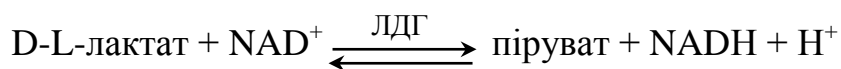
Для кількісного аналізу лактату в біологічних рідинах широкого використання набули ензиматичні та ензиматично-хімічні методи на основі NAD<sup>+</sup>-залежної лактатдегідрогенази (ЛДГ) із м'язів ссавців. Хоча, нещодавно, деякі фірми (Sigma-Aldrich) почали випускати L- та D-селективну NAD<sup>+</sup>-залежну ЛДГ, проте її використання в біоаналітиці ще не набуло широкого використання. Найбільш розповсюдженими є методи на основі ЛДГ, здатної неселективно окислювати L- та D-енантіомери лактату.

**Спектрофотометричне визначення вмісту лактату** базується на принципі зміни оптичної густини реакційної суміші внаслідок ензиматичного відновлення NAD<sup>+</sup>:



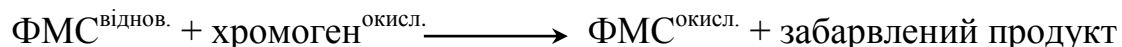
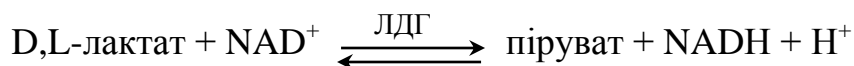
Детекцію проводять в ультрафіолетовому спектрі при довжині хвилі близько 340 нм і обрахунок ведеться із врахуванням коефіцієнту мілімолярної екстинції NADH 6,22 мМ<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>. Проте, описана реакція є оборотною і константа рівноваги зміщена в бік утворення лактату. Для зміщення рівноваги в бік окислення лактату використовують різні підходи: високе значення рН та

підвищену концентрацію  $\text{NAD}^+$  [91], допоміжні реагенти – гідразин або гідроксиламін, які, реагуючи із піруватом, запобігають перебігу зворотної реакції [92, 93]. Крім того, широко використовується введення в реакційну суміш додаткових ферментів – глутамат-піруваттрансамінази [94, 95] або аланін-амінотрансферази (АЛАТ) [93]:



На основі наведеної вище схеми розроблено низку комерційних аналітичних наборів для визначення лактату (Sigma, BioVision, Roche, Enzytec<sup>TM</sup>, Boehringer Mannheim, Megazyme та ін) [87, 96].

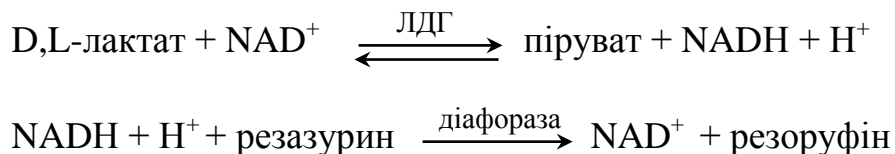
**Колориметричне визначення лактату** базується на утворенні кольорового продукту внаслідок відновлення певного хромогену. Для каталізу цієї реакції використовують низькомолекулярний медіатор електронного перенесення – феназинметосульфат (ФМС):



Як хромоген запропоновано використовувати нітротетразолій хлорид (НТЗХ) в лужному буфері із додаванням 2-аміно-2-метил-1,3-пропанодіолу (АМПД) для зв'язування пірувату. Вимірювання оптичної густини реакційної суміші проводили при 540 нм [97, 98]. Описано метод детекції лактату із використанням як хромогену *n*-йодонітротетразолієвого фіолетового (НТЗФ) за утворенням формагану та його детекції при 540 нм [99].



**Флуориметричне визначення лактату** базується на поєднанні ензиматичного відновлення  $\text{NAD}^+$  ЛДГ та окислення діафорозою резазурину до резорурфіну, здатного до флуорестценсії:



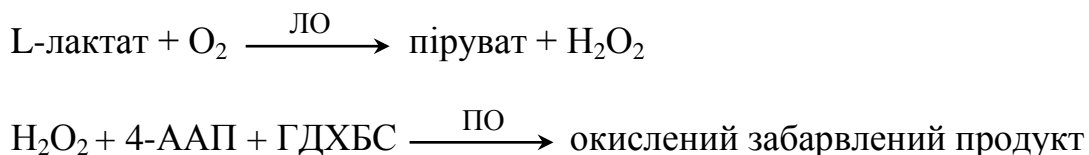
Метод характеризується широкою лінійністю (1-1000 мкМ) та високою точністю аналізу [100].

Усі описані методи на основі  $\text{NAD}^+$ -залежної ЛДГ мають низку недоліків: неабсолютна селективність, необхідність використання екзогенного кофактору та додаткових піруват-зв'язуючих реагентів (наприклад, гідразину або АМПД) чи ферментів (глутамат-піруваттрансамінази або аланін-аміотрансферази), що додатково підвищує вартість методів та ускладнює процедуру аналізу.

### **1.7.1.2. Визначення молочної кислоти з використанням бактерійної лактатоксидази**

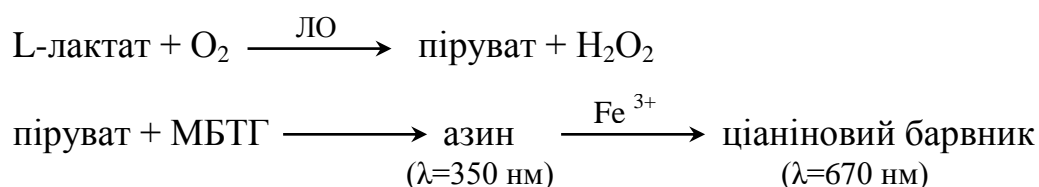
Як правило, в аналітичній практиці використовується лактатоксидаза (ЛО) із *Pediococcus sp.*

**Колориметричне визначення лактату** базується на пероксидазному окисленні певних хромогенних систем, що призводить до зміни оптичної густини реакційної суміші. Пероксид водню є побічним продуктом оксидазної реакції. Внаслідок ензиматичної реакції пероксидази (ПО) із  $\text{H}_2\text{O}_2$  відбувається одночасне окислення хромогену, що зумовлює перебіг кольорової реакції. Відома хромогенна система на основі суміші 4-аміноантипірину (4-ААП) та 2-гідроксил-3,5-дихлорбензолсульфонату (ГДХБС):



Вимірювання оптичної густини реакційної суміші проводять при 510 нм [86]. Іншим відомим хромогеном для аналогічної ферментативної системи є 2,2'-азино-біс-[3-етилбензтіазолін сульфонат-6] (АБТС). Максимальне світлопоглинання відповідного барвника спостерігається при 405 нм [101].

Розроблено також ензиматично-хімічний метод визначення лактату на основі ЛО. У цьому методі пероксидазну реакцію, внаслідок якої утворюється кольоровий продукт, замінено на хімічну взаємодію пірувату – продукту лактатоксидазної реакції - із 3-метил-2-бензотіазоліонгідразоном (МБТГ) за присутності в реакційному розчині йонів заліза (III):



Розроблений метод має низку переваг у порівнянні із методами з використанням пероксидазної реакції – це висока порогова чутливість та економічність [75].

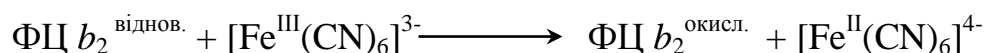
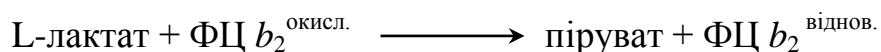
Описані методи на основі ЛО характеризуються недостатньою чутливістю та необхідністю попередньої обробки дослідних зразків (депротеїнізації), що ускладнює проведення аналізу.

### 1.7.1.3. Визначення вмісту лактату на основі ФЦ $b_2$

У клітинах дріжджів мітохондріальний ФЦ  $b_2$  каталізує дегідрогенізацію L-лактату до пірувату, переносячи електрони з L-лактату через флавінмононуклеотид (ФМН) на проміжний акцептор електронів – групу гема фермента. Кінцевим акцептором електронів *in vivo* є цитохром *c*. Прямого перенесення електронів від відновленої групи ФМН<sub>2</sub> інтактного ферменту до цитохрому *c* не виявлено, що підтверджує проміжну акумуляцію електронів в

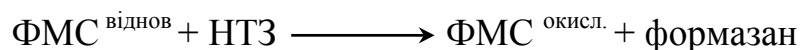
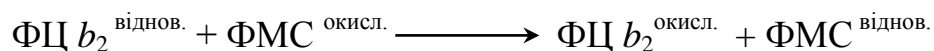
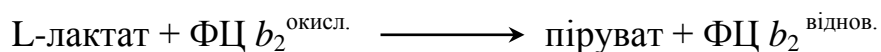
групі гема.

Описано метод визначення вмісту лактату із використанням ФЦ  $b_2$  із клітин дріжджів *Hansenula anomala*. В основі методу покладено здатність ФЦ  $b_2$  переносити електрон, утворений внаслідок ензиматичного окислення лактату, на гексаціаноферат(III) з утворенням відновленого гексаціаноферату(II):



Внаслідок описаних реакцій змінюється оптична густина реакційної суміші, що робить можливим проведення колориметричного аналізу. Світлопоглинання реакційної суміші вимірюють у видимій ділянці спектру при 420 нм. При обрахунку результатів враховують різницю екстинції фери- та фероціаніду при 420 нм, що є рівною  $1,04 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [102].

Інший методу кількісного аналізу L-лактату на основі ФЦ  $b_2$ , виділеного із *O. polymorpha*, базується на принципі відновлення нітротетразолієвого синього (НТЗ) до кольорового продукту – формазану та його детекції при 525 нм [103]:



Перевагами запропонованих методів є їх висока селективність та дешевизна, швидкість та простота проведення аналізу. Недоліками методів є низька чутливість у зв'язку з невисоким значенням молярної екстинції продукту реакції.

#### **1.7.1.4. Визначення D-лактату за використання DLDH**

Описано єдиний метод визначення D-лактату на основі DLDH із клітин грам-позитивних бактерій *Staphylococcus epidermidis*. Це ензимо-флуориметричне визначення методом кінцевої точки із пороговою чутливістю 3,73 нмоль·мл<sup>-1</sup>. Метод було апробовано для кількісного визначення D-лактату в крові здорових людей та пацієнтів із цукровим діабетом. Недоліком методу є недостатня селективність при аналізі зразків крові [104].

#### **1.7.2. Біосенсорні підходи визначення L- і D-молочної кислоти**

Серед нових біоаналітичних систем особливого розвитку останнім часом набули дослідження в області біоелектронних систем аналізу, в яких аналітичний пристрій – біосенсор – є гібридом селективного біоелемента – генератора первинного метаболічного чи біохімічного сигналу та чутливого трансдуктора – фізичного чи фізико-хімічного перетворювача первинного відгуку в певний інструментальний сигнал.

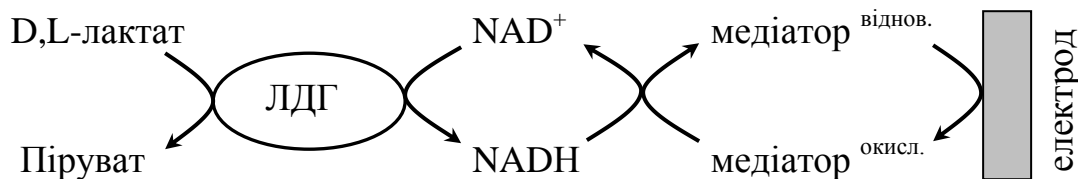
Під спільним терміном “електрохімічні біосенсори” об’єднуються сенсори, що мають спільну електрохімічну природу, але відрізняються за характером перетворювача. Основна принципова відмінність між ними полягає у природі вимірюваного електрохімічного сигналу: сили струму (амперометричні), різниці потенціалу (потенціометричні), електричної провідності (кондуктометричні).

Амперометричний метод дозволяє визначати дуже низькі концентрації аналіту в аналізованому зразку (до  $10^{-8}$  –  $10^{-9}$  М) і при цьому величина сигналу може змінюватись у межах трьох-чотирьох порядків. При амперометричних вимірах прикладають певний потенціал між електродом порівняння та індикаторним електродом, що призводить до зростання струму, який в свою чергу залежить від концентрації аналізованих електроактивних частинок у розчині. Більшість сучасних амперометричних сенсорів працюють при

постійному потенціалі, що значно спрощує проведення аналізу. Для зниження фонового струму, величина якого може бути суттєвою при низьких концентраціях досліджуваного аналіту, використовують так званий допоміжний електрод. Таким чином, у найпоширеніших амперометричних біосенсорах використовують трьохелектродну конфігурацію, яка включає: робочий електрод (графітовий, платиновий, золотий та ін.), електрод порівняння (як правило Ag/AgCl/3М KCl або насичений каломельний електрод), та допоміжний електрод (платиновий стержень, включений в електронейтральне скло).

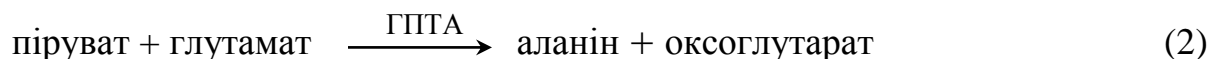
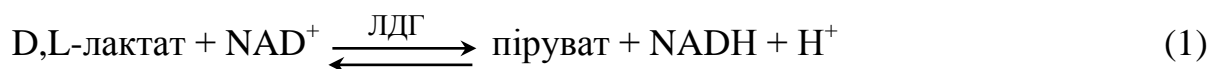
### 1.7.2.1. Біосенсори на основі $\text{NAD}^+$ -залежної лактатдегідрогенази

При створенні лактат-чутливих амперометричних біосенсорів в ролі біоселективного елементу широко застосовується  $\text{NAD}^+$ -залежна лактатдегідрогеназа (ЛДГ) із м'язів ссавців. Використання ЛДГ базується на електрохімічному окисленні NADH, генерованого в результаті дегідрогеназної реакції:



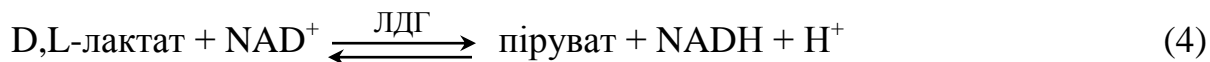
Для електрохімічного окислення NADH використовуються різноманітні типи медіаторів: електроосаджувані – метиленовий синій або «Берлінська блакить» [105], неорганічні та синтетичні медіатори, адсорбовані на поверхні робочих електродів та у вигляді композитних графітових паст – мендоловий синій [106, 78], нейтральний червоний [107], варіаміновий синій [108], полі(*o*-фенілендіамін) або 3,4-дигідроксибензальдегід [109, 110]. Однак, при використанні  $\text{NAD}^+$ -залежної ЛДГ константа рівноваги зміщена в бік утворення лактату, що потребує використання додаткових реагентів для зміщення рівноваги

в протилежний бік – токсичного гідразину чи введення додаткового ферменту – глутаматпіруваттрансамінази (ГПТА) [109, 111].



Внаслідок реакції відбувається окислення лактату з одночасним відновленням  $\text{NAD}^+$  та утворенням пірувату (1). Піруват усувається за біокаталізу ГПТА у присутності глутамату (2), а відновлений  $\text{NADH}$  електрохімічно реокислюється на поверхні робочого графітового електроду при робочому потенціалі +600 мВ проти  $\text{Ag/AgCl/3M KCl}$  електроду порівняння (3) [111]. Використання сенсора за високого робочого потенціалу ускладнюється додатковими завадами з боку неселективних субстратів та речовин, що здатні легко окислюватись, зокрема: сечової кислоти, L-аскорбату, L-цистеїну, глутатіону та сульфамідних препаратів. Для зниження потенціалу та уникнення цього інтерферуючого впливу, використовують додаткові заходи, наприклад, покриття біочутливої мембрани біосенсора плівкою полі(*o*-амінофенолу) [109], що значно ускладнює процедуру приготування сенсора та часто зумовлює низьку його стабільність.

Описано біосенсори на основі ЛДГ із введенням в біоселективний шар діафрази (ДФ) із *Clostridium kluyver*:



Внаслідок біокаталітичної реакції відбувається окислення лактату з одночасним відновленням  $\text{NAD}^+$  (4). Відновлений  $\text{NADH}$  реокислюється при дії ДФ (5) із відновлення гексаціаноферату(III) - медіатора електронного перенесення (6). Відновлений медіатор електрохімічно окислюється на поверхні робочого електроду. Окислення гексаціаноферату(II) відбувається при робочому потенціалі +300 мВ [112], або +200 мВ [113] проти  $\text{Ag}/\text{AgCl}/3\text{M KCl}$  електроду порівняння. Розроблений біосенсор характеризується дуже хорошою стабільністю при зберіганні. Для прикладу, 90 % вихідного відгуку сенсор зберігав протягом 5 місяців при кімнатній температурі (за умови адсорбції вологи силікагелем та зв'язування кисню пірогалолом). Проте операційна стабільність сенсора була досить низькою – 25 вимірювань. До того ж, використання досить високого електрохімічного потенціалу (+ 300 мВ) призводило до інтерферуючого впливу з боку речовин, що здатні легко окислюватись [112]. Окрім недостатньої селективності, важливим недоліком сенсорів на основі ЛДГ є необхідність внесення в аналізовані розчини екзогенного кофактора ( $\text{NAD}^+$ ), що зумовлює дороговизну методів.

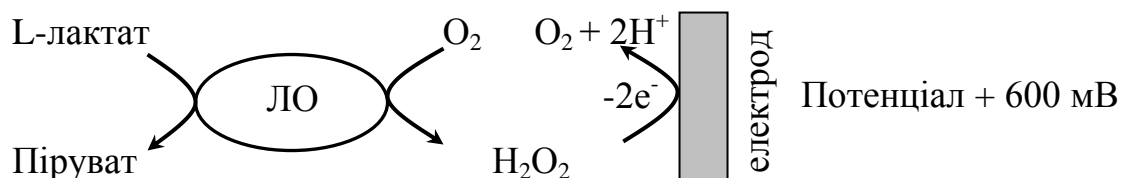
#### **1.7.2.2. Біосенсори на основі бактерійної лактатоксидази**

Лактатоксидази (ЛО) – це флавоензими, здатні окислювати L-лактат із використанням кисню як акцептора електронів. У біосенсоріці найчастіше використовують ЛО із *Pediococcus sp.* [114-116]. Водночас, проводяться дослідження із ЛО, виділеної з альтернативних мікробних джерел - *Mycobacterium smegmatis*, *Streptococcus sp.* [117, 118] та *Aerococcus viridans* [119].

У випадку використання біосенсорів на основі бактерійної ЛО детекція лактату ведеться або за зменшення концентрації споживаного кисню, як субстрату ЛО, або за генерованим в результаті оксидазної реакції пероксидом водню. Використання першого способу обмежується його низькою

селективністю. Для забезпечення окислення або відновлення пероксиду водню на поверхні робочого електроду, розроблено різні електрохімічні підходи, у тому числі з використанням додаткових ферментів.

Пряме електрохімічне окислення пероксиду водню відбувається при дії високого потенціалу (+ 600 мВ), прикладеного до робочого електроду. При цьому схема реакцій для цього методу виглядає наступним чином:



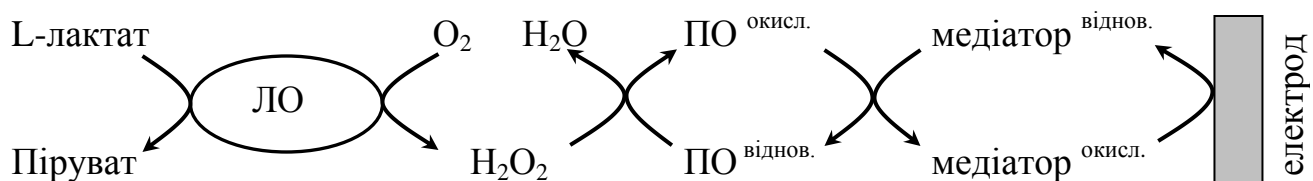
Проте, негативним аспектом використання прямого електрохімічного окислення пероксиду водню при високому робочому потенціалі є дуже низька селективність внаслідок значного інтерферуючого впливу різних легкоокислюваних сполук – аскорбату, урату, глутатіону, тощо.

Для зменшення величини потенціалу окислення  $H_2O_2$  використовують модифікацію поверхні робочого електрода медіаторами електронного переносу: «Берлінської блакиті» [120-122], фeroцену та його похідних [114, 123], метиленового зеленого [118] та ін.

Іншим підходом зниження інтерферуючого ефекту при використанні високих робочих потенціалів окислення  $H_2O_2$  є використання напівпроникних мембран [124], зокрема Нафiонних, що обмежують доступ електроактивних субстратів до поверхні робочого електроду [107; 108].

Альтернативним підходом для уникнення використання високих робочих потенціалів є введення в біосенсорну систему додаткового ферменту - пероксидази хрому (ПО):

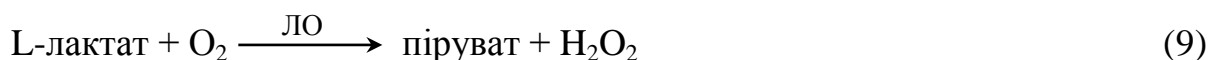
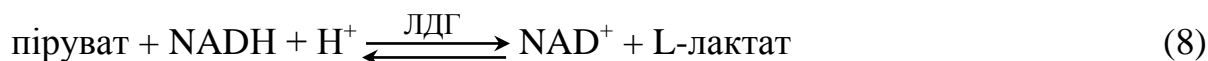
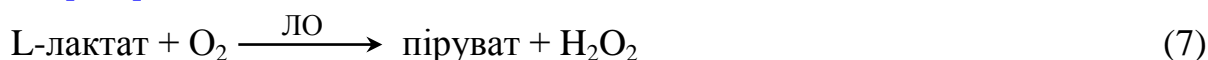




Внаслідок введення у біосенсорну систему ПО, досягається значне зниження робочого потенціалу сенсора: із + 600 мВ до – 50 мВ. Це значно покращує селективність біосенсора, проте, водночас, ускладнює процедуру приготування робочих електродів (потреба в ПО і медіаторі), що знижує їх стабільність [125].

### 1.7.2.3. Біосенсори на основі поєднання бактерійної лактатоксидази та NAD<sup>+</sup>-залежної лактатдегідрогенази

Описано оригінальний біосенсор на основі поєднання бактерійної ЛО та NAD<sup>+</sup>-ЛДГ, співсаджених на плівці поліаналіну. Перевагою такого біферментного сенсора є посилення сенсорного сигналу за рахунок рециклінгу аналітів [126].

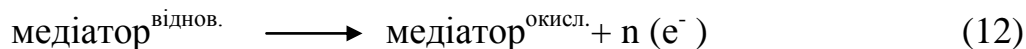


ЛО каталізує окислення L-лактату до пірувату, який є субстратом для ЛДГ. Таким чином, лактат повторно генерується ЛДГ з пірувату в присутності NADH.

Рециркуляція субстрату в такій біферментній системі дозволяє підсилити електрохімічний сигнал, що в свою чергу, сприяє підвищенню чутливості аналізу. Порогова чутливість такого біосенсора є близькою 5 мкМ, а межі лінійного визначення лактату – 0,1-1 мМ [126]. Проте, дана сенсорна архітектура не знайшла практичного використання через її складність і необхідність внесення екзогенного кофактору (NADH).

#### 1.7.2.4. Біосенсори на основі ФЦ $b_2$

До наших досліджень не описано використання ФЦ  $b_2$  *O. polymorpha* як біоселективного елементу біосенсорів. Водночас доведено можливість використання інтактних клітин *H. anomala* [127-129], *S. cerevisiae* [130-132] та ліпідомісних уламків клітин цього виду дріжджів, що містять ФЦ  $b_2$  [133], для приготування біосенсорів на L-лактат. Для забезпечення кращого супряження ензиматичного окислення лактату із електродним процесом запропоновано низку вільнопроникаючих медіаторів: феназинмотасульфат [131], фериціанід калію [127], 2,6-дихлорфеноліндофенол, 1,2-нафтохінон-4-сульфоксид [132], Нільську блакить, метиленовий синій, толуїдиновий синій, мендоловий синій та електроосаджену «Берлінську блакить» [130]. Протікаючі реакції описуються наступною схемою:



У наведеній схемі (10) - ензиматична реакція ФЦ  $b_2$  з лактатом, (11) - хімічна реакція ФЦ  $b_2$  з медіатором, (12) - реакція електрохімічного окислення відновленої форми медіатора, яка, властиво, і використовується в амперометрії.

Для описаних сенсорів на основі клітин *S. cerevisiae* характерне коливання значення  $K_M$  від 1 мМ до 2,45 мМ щодо лактату, максимальна величина можливого струму ( $I_{\text{макс.}}$ ) - 413 нА, тривалість аналізу до повного насичення сенсора - 30 с і лінійність - до 1 мМ лактату. Недоліками розроблених біосенсорів є тривалий період стабілізації робочих електродів (30 – 45 хв при постійному перемішуванні), низька стабільність біоелектродів ("половина життя" сенсора

припадала на добу зберігання в робочому буфері) та низький рівень відтворюваності [130-132].

У випадку використання клітин *H. anomala*, величина  $I_{\text{макс}}$  сенсора була рівна 1,2 мкА, стаціонарний рівень сенсора спостерігався на 2-у хвилину після введення аналіту, лінійний діапазон для L-лактату - до 1 мМ. Сенсор характеризувався достатньо високою стабільністю при зберіганні – 4 тижні, проте не був достатньо селективним і давав неспецифічний відгук на глюкозу, сечову кислоту та інші аналіти [127].

Описано ензимний біосенсор на основі ФЦ  $b_2$  із *H. anomala* іммобілізованого на скловидному карбоновому електроді, модифікованому карбоною черню [128]. У цій сенсорній системі хіноїді групи карбонової черні виконували роль медіатора, що дозволило знизити робочий потенціал біосенсора до  $-100$  і  $-200$  мВ проти каломельного електроду порівняння. Відємні робочі потенціали такого біосенсора дозволили знизити інтерферуючий вплив аскорбату на сенсорний сигнал. Водночас, сенсор характеризувався тривалою відповіддю на внесений лактат, що досягала 1-1,5 хв, і суттєво ускладнювала сенсорний аналіз [128].

З огляду на це, необхідна розробка нових високоселективних та чутливих біоаналітичних методів визначення вмісту лактату, зокрема, із використанням флавоцитохрому  $b_2$  термотолерантних метилотрофних дріжджів *O. polymorpha*.

#### **1.7.2.5. Біосенсори на основі DLDH**

Описано єдиний приклад конструювання амперометричного біосенсора на D-лактат із використанням DLDH із пекарських дріжджів. Біосенсор було сконструйовано на основі утримання DLDH (з активністю  $0,4$  Од·мг<sup>-1</sup>) у вуглецевій пасті, з використанням ФМС як медіатора електронного переносу. Біосенсор характеризувався лінійним діапазоном визначення в межах

0,015–100 мМ D-лактату, пороговою межею виявлення 56 мМ та 6,6 % рівнем відносної стандартної похибки аналітичних результатів. Біоелектроди зберігали 80 % вихідного сигналу протягом 4 тижнів зберігання при 4 °С, а операційна стабільність сенсора (близько 100 послідовних вимірювань 10 мМ D-лактату) дає змогу багатократного його використання [134]. Розроблений біосенсор було апробовано на зразках пива.

## **1.8. Використання наносіїв для конструювання лактат-селективних біосенсорів**

Специфічні властивості наноматеріалів відкривають широкі можливості для створення нових біосенсорів із покращеними операційними параметрами. Однією із основних особливостей наночастинок (НЧ) є висока хімічна активність, що обумовлена їх підвищеною здатністю до іонного чи атомного обміну, адсорбції, до утворення поверхневих зв'язків із адсорбатами [135]. Для хімічного синтезу НЧ використовують різноманітні методи, що відрізняються типом реагента і системи, в якій здійснюється процес [136]. Доступні методи синтезу НЧ, а також їх спорідненість до багатьох біологічних молекул робить їх привабливими кандидатами для досліджень у сенсорних технологіях [137].

### **1.8.1. Біосенсори на основі $\text{NAD}^+$ -залежної лактатдегідрогенази та наносіїв різної природи**

При конструюванні лактатних біосенсорів з покращеними операційними характеристиками (чутливість, стабільність, лінійність, точність) найчастіше використовують наночастинки на основі перехідних металів, їх оксидів та різноманітних модифікацій Карбону.

Описано конструювання високочутливого безмедіаторного біосенсора на основі  $\text{NAD}^+$ -ЛДГ, іммобілізованої хітозаномом на наностержнях ZnO [138].

Перенесення електронів із активного центру ЛДГ на поверхню золотого робочого електроду забезпечувалось ZnO-наностержнями. Сконструйований біосенсор характеризувався чутливістю  $1,83 \text{ A}\cdot\text{M}^{-1}$ , низькою пороговою межею виявлення  $4,73 \text{ нМ}$ , лінійністю в межах  $0,2 - 0,8 \text{ мМ}$  лактату та стабільністю зберігання 28 днів [138].

Сконструйовано дуже стабільний біосенсор на лактат з використанням співосадження ЛДГ із  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -модифікованими Карбоновими нанотрубками [139]. Наночастинки  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  виконували роль медіатора електронного переносу із NADH на поверхню робочого електроду при низькому робочому потенціалі ( $0,0 \text{ В}$  проти Ag/AgCl електроду порівняння). Біосенсор характеризувався пороговою межею виявлення на рівні  $0,3 \text{ мкМ}$ , чутливістю  $7,67 \text{ mA}\cdot\text{M}^{-1}$ , лінійністю в межах  $50 - 500 \text{ мкМ}$  лактату. Завдяки механічній та хімічній стабільності  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -модифікованих вуглецевих нанотрубок біосенсор відзначався високою стабільністю при зберіганні. Сенсор демонстрував  $96 \%$  відповіді вихідного сигналу після двотижневого його зберігання при кімнатній температурі [139].

Для забезпечення широкого лінійного діапазону визначення молочної кислоти запропоновано співосадження LDH та золотих наночастинках у золь-гелі 3D-силікатної матриці. Така сенсорна архітектура забезпечила широкі межі лінійності біоелектродів при визначенні лактату  $0,0 - 0,8 \text{ мМ}$ . Біосенсор характеризувався досить високою чутливістю -  $0,446 \text{ A}\cdot\text{M}^{-1}$  та пороговою межею визначення  $0,1 \text{ мкМ}$  лактату [140]. Інші лактат-селективні біосенсор із широкою межею лінійного визначення ( $0,2 - 2 \text{ мМ}$  лактату) базуються на використанні ЛДГ, іммобілізованої на наночастинках  $\text{CeO}_2$  [141] або на наночастинках золота на відновленому оксиді графена (лінійний діапазон визначення становив  $10 \text{ мкМ} - 5 \text{ мМ}$ ) [142].

Описано використання багатостінних Карбонових нанотрубок з іммобілізованим ментоловим синім у поєднанні із ЛДГ при конструюванні дуже

точного біосенсора на лактат. Такий біосенсор характеризувався чутливістю на рівні  $34,6 \text{ A}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ , лінійним діапазоном визначення в межах 0,1 – 10 нМ лактату та хорошою точністю аналізу (95 %) в порівнянні із референтним спектрофотометричним методом [106]. Інший високоточний лактатний біосенсор базувався на іммобілізації ЛДГ на наночастинках оксиду графену. Біосенсор характеризувався граничною межею визначення на рівні 0,1 мкМ, межею лінійності 5 - 50 мМ лактату та високою точністю результатів при аналізі сироватки крові людини, порівнюючи їх із результатами стандартного колориметричного методу ( $R = 0,99$ ) [143].

### **1.8.2. Біосенсори на основі бактерійної лактатоксидази та нанорозмірних носіїв**

Для конструювання високочутливого лактатного біосенсора на основі ЛО запропоновано використання діамантових наночастинок, іммобілізованих на золотому електроді. Чутливість біосенсора становила  $2,6 \text{ A}\cdot\text{M}^{-1}$  із пороговою межею виявлення 16 мкМ, а лінійний діапазон визначення відповідав 0,053 мМ - 1,6 мМ L-лактату [144]. Використання нанокомпозитної плівки на основі Карбонових нанотрубок, модифікованих Os-полівінілімідазолом та хітозаном також сприяло високій чутливості біосенсора ( $1,9 \text{ A}\cdot\text{M}^{-1}$ ) на основі ЛО [145].

Описано конструювання лактат-селективного біосенсора із високою стабільністю при зберіганні, що базувався на використанні ЛО, іммобілізованої в хітозані, модифікованому багатостінними Карбоновими нанотрубками. Біосенсор зберігав 82 % вихідної відповіді на аналіт після 5 місяців його зберігання при 4 °С, його лінійний діапазон визначення відповідав 30,4 - 244 мМ L-лактату, чутливість становила  $3,42 \text{ mA}\cdot\text{M}^{-1}$ . Водночас, біосенсор демонстрував незадовільну порогову чутливість (22,6 мМ L-лактату), що робить можливим

його використання виключно для вимірювання зразків із високим вмістом цього аналіту [146]. Багатостінні Карбонові нанотрубки, модифіковані платиновими нанонитками, використано при конструюванні ще одного біосенсора на основі ЛО, що характеризувався наступними операційними параметрами: лінійним діапазоном в межах 0,2 – 2,0 мМ L-лактату, чутливістю 6,36 мА·М<sup>-1</sup>, високою стабільністю при зберіганні (виявляв 90 % величини вихідного відгуку сенсора після 4 тижнів зберігання) [147]. Використання нанопокриття In<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, модифікованого композицією поліанілін/фторанілін з іммобілізованою ЛО, дозволило сконструювати лактатний біосенсор з високою операційною стабільністю (150 аналізів протягом 26 днів використання жодним чином не впливало на зниження активності ферменту та сигналу біоелектродів). Біосенсор демонстрував широкий лінійний діапазон 0,1 - 5,5 мМ, з пороговою межею визначення 0,1 мМ L-лактату, а чутливість біосенсора становила 1,8 мА·М<sup>-1</sup> [148].

Для забезпечення широкого лінійного діапазону визначення вмісту L-лактату запропоновано сенсорну архітектуру, що включала ЛО, іммобілізовану на поверхні Карбонових нановолокон, модифікованих наночастинками платини. Біосенсор характеризувався високою чутливістю 368 А·М<sup>-1</sup>·м<sup>-2</sup>, пороговою межею виявлення 11 мкМ, діапазоном визначення в межах лінійності 25 - 1500 мкМ L-лактату [149].

Таким чином, можна зробити висновок, що операційні характеристики біосенсорів для аналізу лактату (чутливість, стабільність, лінійність, точність) можуть бути суттєво покращені за рахунок використання нанорозмірних об'єктів та нанокомпозитних матеріалів.

## 1.9. Підсумки

Аналіз літературних даних демонструє високий науково-практичний інтерес до L- і D-лактат-селективних оксидоредуктаз дріжджів. Водночас,

основна увага цих досліджень сконцентрована на ферментах із двох видів дріжджів - *S. cerevisiae* та *K. lactis*. Для ФЦ  $b_2$  та DLDH цих видів широко представлено їх структурна, ензимологічна, фізико-хімічна характеристика та регуляція їх синтезу в дріжджових клітинах. Водночас, ферменти, виділені із *S. cerevisiae* та *K. lactis* характеризуються високою лабільністю і складністю їх біоаналітичного використання, саме цим зумовлена відсутність на сьогодні на світовому ринку комерційних препаратів обох ферментів. Альтернативним джерелом стабільних форм ФЦ  $b_2$  та DLDH може слугувати термотолерантний вид дріжджів *O. polymorpha*. Дослідження, спрямовані на генно-інженерне конструювання продуцентів цих ферментів на основі термотолерантних клітин *O. polymorpha*, дослідження регуляції їх синтезу, ензимологічна, фізико-хімічна характеристика ФЦ  $b_2$  та DLDH має високий науково-практичний потенціал.

З аналізу описаних ензиматичних методів визначення вмісту лактату видно, що більшість із них має низку недоліків, основні із яких: низька селективність, громіздкість та дороговизна апаратури, необхідність у використанні додаткових реагентів або ферментів, недостатня стабільність (операційна та при зберіганні) і чутливість до інтерферуючого впливу супутніх речовин (більшість відомих біосенсорних методів). Водночас, використання нанорозмірних носіїв різної природи сприяє суттєвому покращенню основних операційних параметрів біосенсорів підвищуючи, їх чутливість, стабільність, лінійність та точність визначення.

З огляду на це, необхідна розробка нових високоселективних, чутливих та простих біоаналітичних методів визначення вмісту L- та D-лактату, зокрема, із використанням рекомбінантних клітин термотолерантних метилотрофних дріжджів *O. polymorpha* - надпродуцентів ФЦ  $b_2$  і DLDH - та новітніх мікро/нано-розмірних об'єктів в ролі носіїв ферментів.



## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

#### 2.1. Об'єкти дослідження

У роботі використовували наступні мікробні штами із колекції Інституту біології клітини НАН України:

*Ogataea polymorpha* 356 лінії DL1;

*O. polymorpha* NCYC495 (*leu1-1*);

*O. polymorpha* CBS 4732;

*O. polymorpha* K-105 (*gcr1 catX*) – безкаталазний мутант метилотрофних дріжджів з порушеною глюкозною катаболітною репресією синтезу алкогольоксидази;

*E. coli* DH5 $\alpha$ .

#### 2.2 Основні молекулярно-генетичні методи

##### 2.2.1. Плазмід

Плазмід, що використовувались у даній роботі, представлено у таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Перелік векторів, використаних у даній дисертаційній роботі

Назва	Посилання на конструювання
pHIPX2	[150]
pHIPX2_CYB2	Розділ 3.1.1.
pGLG61	[151]
pGLG61_CYB2	Розділ 3.1.1.
pUC57	Fermentas, Вільнюс, Литва
pPICZ-B	Invitrogen, Карлсбад, штат Каліфорнія, США
pLR_cyb2_Z	Розділ 3.1.3.
pGLG61_DLD1_Hp	Розділ 3.1.3.

### 2.2.2. Праймери

Праймери, що використовувались у даній роботі, представлено у таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Перелік векторів, використаних у даній дисертаційній роботі

Назва праймера	Послідовності (5'-3') сайтів рестрикції (курсив/підкреслення)	Сайти рестрикції
Ко258	CGGG <u>G</u> TACCCG TAGCAGAAGAGCATCGATG	<i>KpnI</i>
Ко259	GACTTCGTTGCTCTTCTGCAC <u>CTGCAGGCCTGTGGT</u> AAATGCTCTATAG	<i>PstI</i>
Ко260	CTATAGAGCATTTACCACAGGC <u>CTGCAGGTGCAG</u> AAGAGCAACGAAGTC	<i>PstI</i>
Ко261	CCCA <u>A</u> GCTTGAGCACGAGAGACACCACAAG	<i>HindIII</i>
VA158	TCG <u>CTGCAG</u> CACACACCATAGCTTCAAAATG	<i>PstI</i>
VA159	CCA <u>CTGCAG</u> CAGCTTGCAAATTAAAGCCTTC	<i>PstI</i>
Ко248	CAATCTAAAGTACAAAAACAAG <u>GGTACCATG</u> cacc accassaccassacAATTTATTCCGACAGAGAGG	<i>KpnI</i>
Ко249	CCGGAATTC <sup>a</sup> <u>GGATCC</u> <sup>b</sup> CAAGATTTACACAAGGC	<i>EcoRI</i> <sup>a</sup> ,
Ко184	CGCGGATCCCATCGAATGTAATGAGC	<i>BamHI</i> <sup>o</sup>
Ко247	CCTCTCTGTCGGAATAAATTgtggtggtggtggtggtgCAT <u>GGTACCTTTGTTTTTGTACTTTAGATTG</u>	<i>KpnI</i>
Ко262	CAAAGTACGGCTCCAGTTGCG	-
Ко263	CCACTGCAAGACGCCGTTTG	-
S16	CGGGTAATTAACGACACCCTAG	-
S17	CACATCCGCTCTAACCGAAAAG	-

<sup>a,б</sup> Сайти рестрикції з відповідним рестрикційним ферментом.

### 2.2.3. Поживні середовища та умови культивування

Вихідні штами дріжджів зберігали на скосах із сусло-агаром.

Дріжджі вирощували до середини логарифмічної або стаціонарної фази росту (в залежності від експерименту) в колбах Ерленмейера на круговому

шейкері (240 об./хв) при 37 °С на багатому середовищі (YPD: 1% дріжджовий екстракт, 1,5% пептон, 2% глюкоза [152] або мінеральному середовищі Беркгольдера - СБ [153] наступного складу:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – (0,5 – 1) г/л;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – (3 – 3,5) г/л;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – (0,2 - 0,5) г/л;  $\text{CaCl}_2$  – 0,1 г/л; сіль Мора – (0,2 мг – 1). До СБ додавали дріжджовий екстракт "Діфко" до 0,05%. В залежності від мети експерименту, використовували різні джерела Карбону та енергії: глюкоза (Glc); L-лактат натрію (Lact), етанол (EtOH), гліцерол (GlOH) чи їх суміші в різних співвідношеннях. При вивченні впливу іонів двовалентних металів на активність цільового фермента в клітинах, в середовище додавали розчин 1 мМ  $\text{ZnSO}_4$  або  $\text{FeSO}_4$ .

Селекцію трансформантів *O. polymorpha* проводили на середовищі з зеоцином (130-300 мг/л), генетицином (0,3-1 г/л).

Бактерії *E. coli* DH5 $\alpha$  вирощували при 37 °С на багатому (LB) середовищі, [152]. Для селекції плазмидовмісних бактерій використовували ампіцилін у концентрації 100 мг/л.

#### **2.2.4. Виділення сумарної ДНК з клітин дріжджів**

Даний метод є модифікацією методів, розроблених для *Candida maltosa* [154] та *S. cerevisiae* [155] з використанням літикази для сферопластування клітин, протеїнази К для руйнування білків, рибонуклеази А для розщеплення РНК та з подальшим осадженням ДНК спиртом. Цей метод використовується для виділення (через ретрансформацію *E. coli*) плазмідної ДНК з клітин дріжджових трансформантів. Метод було оптимізовано при виконанні даної роботи.

Клітини нарощували в 10 мл рідкого селективного середовища при 30 °С до пізньої логарифмічної фази (оптична густина 4-6; довжина хвилі 600 нм, кювета 1 см). Біомасу осаджували центрифугуванням і ресуспендували в 1 мл ST буферу (1 М сахароза, 50 мМ Tris-HCl, рН 8,0); потім переносили у мікроцентрифужні

пробірки і додавали 10 мкл меркаптоетанолу. До ресуспендованих клітин додавали літиказу (800 МО) та інкубували 40-60 хв при 30 °С. Одержані сферопласти центрифугували за м'яких умов (при 1000 g); осад ресуспендували в 300 мкл SE буфера (0,2% SDS, 50 мМ ЕДТА, рН 8,0) та інкубували 20 хв при 65 °С. Пробір охолоджували до кімнатної температури, додавали 15 мкл протеїнази К (1 мг/мл) та 10 мкл РНКазі А (10 мг/мл), перемішували та інкубували 30-40 хв при 37 °С. До інкубаційної суміші додавали 150 мкл 5 М ацетату калію (рН 4,8), перемішували та витримували на льоді 30 хв, центрифугували при 4000 g 5 хв; до супернатанту додавали однаковий об'єм фенолу, насиченого буфером. Центрифугували при 4000 g 15 хв, водну фазу переносили у свіжу центрифужну мікропробірку, додавали 0,6 об'єму ізопропанолу. Одержаний осад центрифугували, промивали 70 % етанолом та підсушували. Одержану нуклеїнову кислоту розчиняли в 100-150 мкл ТЕ буферу, додавали 1/3 об'єму 7,5 М ацетату амонію, перемішували та залишали протягом 20 хв на льоді; центрифугували (4000 g 10 хв), відбирали супернатант і осаджували ДНК двома об'ємами етанолу. Знову центрифугували, осад промивали 70 % етанолом і підсушували. Виділену ДНК розчиняли у 50-100 мкл ТЕ буферу, зберігали при -20 °С.

### **2.2.5. Трансформація клітин мікроорганізмів**

Трансформацію клітин *O. polymorpha* проводили методом електропорації, як описано раніше [150]. Після трансформації дріжджів *O. polymorpha* клітинну суміш інкубували протягом 4-5 години при 37 °С перед висівом на чашки з антибіотиком G418. Продовжена інкубація мала на меті підвищити ефективність мультикопійної інтеграції відповідних плазмід в геном реципієнтних штамів.

Трансформацію бактерій *E. coli* проводили медом електропорації [156].

### 2.2.6. Базові молекулярно-генетичні методи

Виділення сумарної ДНК з клітин *E. coli*, виділення плазмідної ДНК, підготовку та трансформацію компетентних клітин *E. coli*, електрофорез ДНК в агарозному гелі, елюцію фрагментів ДНК з агарозного гелю, розщеплення ДНК рестриктазами, дефосфорилування кінців ДНК, затуплення «липких» (комплементарних) кінців лінеаризованої ДНК за допомогою T4 ДНК-полімерази, лігування лінеаризованих фрагментів ДНК, ампліфікацію фрагментів ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), аналіз ДНК проводили методом гібридизації за Саузерном, [156]. Очистку ДНК здійснювали 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) (Табл. 2.2). Визначення нуклеотидної послідовності фрагментів ДНК проводили на фірмі «Biocentrum» (США) та «Genomed» (Польща).

### 2.2.7. Програмне забезпечення для пошуку та аналізу нуклеотидних послідовностей

У роботі використовувалась база даних *O. polymorpha* - <http://genome.jgi-psf.org/Hanpo2/Hanpo2.home.html>. Аналіз нуклеотидної послідовності ДНК проводили за допомогою програм: NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>); Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) 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/>.

## 2.3. Мікробіологічно-біохімічні методи

### 2.3.1. Визначення концентрації клітин

Біомасу клітин (в мг абсолютної маси на 1 мл суспензії) визначали за мутністю розведених суспензій шляхом їхнього фотометрування на фотоелектроколориметрі ФЕК–56М (при 540 нм, світлофільтр № 6, кювета з довжиною оптичного шляху 3 мм). Коефіцієнт перерахунку для ФЕК–56М визначали за кривою гравіметричного калібрування. Розрахунок концентрації клітин проводили за формулою:

$$C = \frac{E \cdot n}{1,33}$$

де  $C$  – концентрація клітин;  $E$  – оптична густина при 540 нм;  $n$  – розведення вихідної суспензії; 1,33 – коефіцієнт перерахунку, визначений при калібруванні гравіметричним методом.

### 2.3.2. Пермеабілізація клітин *O. polymorpha*

Відмиту від середовища біомасу клітин ресуспензували у 50 мМ К-На-фосфатному буфері, рН 7,8, що містив 2 мМ ЕДТА, до концентрації клітин 20 - 50 мг/мл (у перерахунку на суху масу). До суспензії клітин додавали рівний об'єм водного розчину дигітоніну або цетилтриметиламоній броміду (2 мг/мл). Суміш інкубували на водяній лазні при 30 °С з перемішуванням кожні 2 - 3 хв упродовж 15 хв. Після пермеабілізації клітини тричі відмивали відповідним буфером. Пермеабілізовані клітини *O. polymorpha* використовували для визначення активності ФЦ  $b_2$  та неспецифічних ферохелатредуктаз. Концентрацію "тіней" *O. polymorpha* (пермеабілізованих клітин) визначали як у випадку інтактних клітин (див. 2.3.1).

### 2.3.3. Виділення субклітинних фракцій клітин *O. polymorpha*, збагачених мітохондріями

Субклітинні фракції клітин *O. polymorpha* «tr6» отримували за модифікованою методикою Грегга [157]. Осаджені клітини дріжджів ресуспендовували у DTT-буфері (2 мл буферу на 1 г сирової маси клітин). Склад DTT-буферу наступний: 100 мМ Тріс-Н<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, рН 9,4 та 10 мМ дитіотрейтол. Ресуспендовані клітини у флаконі (50 мл) інкубували на шейкері при 30 °С, 220 об·хв<sup>-1</sup> упродовж 20 хв. Клітини осаджували протягом 5 хв. при 3000 g та ресуспендовували у фосфатному буфері (20 мМ ФБ, рН 7,4 та 1,2 М сорбіт); вносили 7 мл буферу на 1 г сирової ваги клітин. Після повторного центрифугування, клітини ресуспендували у цьому ж буфері із додаванням «дріжджолітину» (50 мг ферментного препарату на 1 г клітин) та інкубували протягом 4 годин на шейкері при 30° С , 220 об·хв<sup>-1</sup>, для руйнування клітинної стінки дріжджів. Утворення сферопластів контролювали за допомогою мікроскопу. Отримані сфероласти осаджували центрифугуванням протягом 8 хв при 2200 g і 4 °С та ресуспендували в льодяному буфері для гомогенізації (10 мМ Тріс-НСІ, рН 7,4, 0,6 М сорбіт, 1 мМ ЕДТА) (6,5 мл буфера на 1 г сирової ваги клітин). Усі наступні етапи виконували при 4 °С або на льоді. Суспензію переносили в попередньо охолоджений на льоді скляний гомогенізатор і руйнували сфероласти. До отриманої суспензії, додавали 1 об'єм льодяного буферу для гомогенізації. Незруйновані сфероласти осаджували при 1500 g за температури 4 °С протягом 5 хв. Отриманий супернатант центрифугували протягом 5 хв при 3000 g, 4 °С. Наступну порцію супернатанту центрифугували протягом 15 хв при 12000 g при 4 °С. Осад ресуспендовували у льодяному буфері для гомогенізації (6,5 мл 10 мМ Тріс-НСІ, рН 7,4 на 1 г клітин) та центрифугували протягом 5 хв при 3000 g та 4 °С. Отриманий супернатант фугували протягом 15 хв при 12000 g при 4 °С, а осад ресуспендовували у 3 мл

крижаної буферної системи наступного складу: 10 мМ MOPS-KOH (морфолінопропансульфонова кислота у KOH, рН 7,2, 250 мМ сахароза, 1 мМ ЕДТА) та заморожували при -25 °С для зберігання. Перед використанням субклітинні фракції, збагачені мітохондріями, розморожували при 4 °С.

#### **2.3.4. Отримання безклітинного екстракту**

Вирощені клітини дріжджів промивали двічі водою та один раз 10 мМ К,Na-фосфатним буфером, рН 7,8. Далі до осаду клітин додавали 50 мМ ФБ, рН 7,8 з 2 мМ ЕДТА до кінцевої концентрації клітин 90 - 100 мг/мл та інгібітор серинових протеїназ фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ) у концентрації 0,4 мМ. Одержану суспензію розливали в ємності для гомогенізації, вносили скляні кульки (діаметр 0,45 - 0,5 мм) у кількості 3/4 від об'єму суспензії і заморожували. Клітини руйнували на планетарному гомогенізаторі упродовж 5 хв при 1000 об.·хв<sup>-1</sup> при 4<sup>0</sup>С.

#### **2.3.5. Визначення концентрації білка**

Концентрацію білка в безклітинних екстрактах визначали методом Лоурі, який ґрунтується на утворенні забарвлених продуктів реакції ароматичних амінокислот з реактивом Фоліна у поєднанні з біуретовою реакцією на пептидні зв'язки [158]. Калібрувальним стандартом служив альбумін сироватки бика.

#### **2.3.6. Визначення активності флавоцитохрому $b_2$ та DLDH [34, 159]**

Активність флавоцитохрому  $b_2$  та DLDH визначали спектрофотометрично, за рівнем відновлення фериціаніду калію, при  $\lambda = 420$  нм. При цьому відбувається поступове знебарвлення реакційної суміші.



Склад реакційної суміші для визначення активності флавоцитохрому  $b_2$ : 30 мМ фосфатний буфер, рН 8,0; 0,03 М L-лактат натрію; 1 мМ ЕДТА; 0,083 мМ фериціанід калію ( $K_3Fe(CN)_6$ ); 0,1 мл екстракту.

Склад реакційної суміші для визначення активності: 30 М фосфатний буфер, рН 7,8; 0,016 М D-лактат; 0,083 мМ калію фериціаніду ( $K_3Fe(CN)_6$ ); 0,02 мл екстракту. Питому масову активність (ПА) розраховували за формулою (1), а питому об'ємну активність (ВА) - за формулою (2):

$$(1) \quad PA = \frac{\Delta E / x \cdot V_p \cdot n}{\epsilon_{MM} \cdot C_b \cdot V_e} \quad \text{мкмоль} \cdot \text{хв.}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1};$$

$$(2) \quad VA = \frac{\Delta E / x \cdot V_p \cdot n}{\epsilon_{MM} \cdot V_e} \quad \text{мкмоль} \cdot \text{хв.}^{-1} \cdot \text{мл}^{-1},$$

де  $\Delta E / x \cdot v$  - зміна оптичної густини при 420 нм за хвилину;  $V_p$  - об'єм реакційної суміші, мл;  $n$  - первинне розведення екстракту;  $\epsilon_{MM}$  - мілімолярний коефіцієнт екстинції калію фериціаніду, рівний  $1,04 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ;  $V_e$  - об'єм екстракту, мл;  $C_b$  - концентрація білка в екстракті,  $\text{мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ .

У випадку визначення ПА флавоцитохрому  $b_2$  та DLDH у пермеабілізованих клітинах, замість концентрації білка використовували значення концентрації «тіней» клітин, що визначалась відповідно до методики описаної в розділі 2.3.1.

Питому активність флавоцитохрому  $b_2$  та DLDH ( $\text{мкмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$  білка) розраховували за формулою, враховуючи різницю між специфічною активністю (+ субстрат) і неспецифічною активністю (без субстрату):

$$A = A_{+Lact} - A_{-Lact}.$$

За 1 одиницю активності приймали таку кількість фермента, яка за стандартних умов визначення зумовлює окислення 1 мкмоль стереоспецифічного субстрату за 1 хв.

### 2.3.7. Визначення активності алкогольоксидази (АО)

Активність АО 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 [160].

### 2.3.8. Визначення вмісту лактату ензиматичним методом на основі NAD<sup>+</sup>-залежної ЛДГ [161]

Реакційна суміш містила дослідний зразок, 2 мМ NAD<sup>+</sup>, 2 Од·мл<sup>-1</sup> L-лактатдегідрогенази у 80 мМ гліциновому буфері, рН 9,5, в присутності гідразину. Вимірювання оптичної густини проводили при 340 нм у 1 см кюветі. Концентрацію лактату визначали за попередньо побудованою калібрувальною кривою.

### 2.3.9. Проведення нативного електрофорезу та виявлення зон лактатдегідрогеназної активності ФЦ *b*<sub>2</sub> в ПААГ

#### 2.3.9.1. Умови проведення електрофорезу

Використовували Тріс–гліциновий електрофоретичний буфер, рН 8,3 [162] при 4 °С. Електрофорез проводили на апараті Helicon у камері для вертикального електрофорезу VE-20. Враховуючи, що ізоелектрична точка ФЦ *b*<sub>2</sub> близька 5,6, електрофорез проводили від “-” до “+” 15 хв при 100 В, 13 мА (для фази концентрування) і 1,5–2 год при 220 В, 24 мА (для фази розділення), в градієнтній гелевій пластинці, що містила:

а) концентруючий гель (3 мл):

H <sub>2</sub> O	2,1 мл;
30 % суміш акриламід/метиленабіакриламід	0,5 мл;
1,0 М тріс (рН 6,8)	0,38 мл;

10 % персульфат калію	0,03 мл;
TEMED	0,003 мл.

б) розділяючий гель:

Концентрація гелю	6 % (5 мл)	8 % (5мл)
H <sub>2</sub> O	2,6 мл	2,3 мл
30 % суміш акриламід/метилен-бісакриламід	1 мл	1,3 мл
1,5 М тріс-гліциновий буфер (рН 8,8)	1,3 мл	1,3 мл
10 % персульфат калію	0,05 мл	0,05 мл
TEMED	0,004 мл	0,003 мл

Гелеву пластинку промивали дистильованою H<sub>2</sub>O, і протягом 12 год витримували при 4 °С (для зниження негативного впливу акриламід на ФЦ *b*<sub>2</sub> [163]). В лунки вносили по 40 мкл безклітинних екстрактів із кінцевою концентрацією білка 50 мкг/мл. Електрофорез проводили протягом 3 – 5 год.

### 2.3.9.2. Проявлення зон лактатдегідрогеназної активності ФЦ *b*<sub>2</sub> [164]

Інкубацію гелю після нативного електрофорезу проводили протягом 15–20 хв при кімнатній температурі, у відсутності прямих сонячних променів із сумішшю наступного складу:

- 0,1 М L-лактат натрію;
- 1 мМ K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>;
- 1 мМ EDTA;
- 25 мМ тріс-гліциновий буфер, рН 8,0.

Остаточне проявлення гелів проводили протягом 10 хв у 10 мМ розчині FeCl<sub>3</sub> у 0,25 М HCl.

### 2.3.10. Проведення SDS-електрофорезу

Використовували SDS-електрофоретичний буфер (за Laemmli) [165] рН 8,3. Форез проводили при кімнатній температурі 2 – 3 год в SDS-поліакриламідному гелі, що складався з:

а) 5 % концентруючого гелю (4 мл):

H <sub>2</sub> O	2,7 мл;
30 % суміш акриламід/метиленбісакриламід	0,67 мл;
1,0 М тріс-гліциновий буфер (рН 6,8)	0,5 мл;
10 % персульфат калію	0,04 мл;
10 % SDS	0,04 мл;
TEMED	0,004 мл.

б) 12 % розділяючого гелю (10 мл):

H <sub>2</sub> O	4,0 мл;
30 % суміш акриламід/ метиленбісакриламід	3,3 мл;
1,0 М тріс-гліциновий буфер (рН 6,8)	2,5 мл;
10 % персульфат калію	0,1 мл;
10 % SDS	0,1 мл;
TEMED	0,004 мл.

SDS-поліакриламідні гелі фіксували 15 хв 15 % розчином трихлороцтової кислоти та зафарбовували протягом 2 – 3 год 0,25 % розчином Кумасі яскраво-голубого R 250 у суміші, що містила 10 % оцтову кислоту і 40 % етанол. Гель відмивали 10 % оцтовою кислотою.

### 2.3.11. Виділення та очищення флавоцитохрому *b<sub>2</sub>* із клітин рекомбінантних дріжджів *O. polymorpha*

Нами розроблено схему препаративного очищення ФЦ *b<sub>2</sub>* *O. polymorpha*, основою якого послужив метод, розроблений для дріжджів *H. anomala* [43].

Джерелом фермента служив рекомбінантний штам *O. polymorpha* «tr1» (*gcr1 catX CYB2*). Процедуру виділення фермента проводили із клітин цього виду дріжджів, вирощених при періодичному культивуванні.

Клітини вирощували у 0,5 л колбах при постійній аерації при температурі 30 °С до середини стаціонарної фази росту з наступним осадженням методом центрифугування на центрифугі К 70 D при охолодженні при 4000 об·хв<sup>-1</sup>. Тричі відмиті 20 мМ фосфатним буфером, рН 7,0 осадки клітин відбирали і висушували. Загальна схема виділення цільового фермента описана нижче.

*Стадія 1. Ліофілізація клітин.* Біомасу клітин дріжджів промивали двічі водою та один раз 50 мМ ФБ, рН 7,8 (до концентрації 90 – 100 мг·мл<sup>-1</sup>). Клітини ліофілізували у сублімаційному ліофілізаторі ALPHA 1–4 фірми Martin Christ (Остероде-ам-Гарц, Німеччина) при температурі -40 °С і тиску 0,045 атм. протягом 24 год.

*Стадія 2. Отримання безклітинних екстрактів.* Для приготування суспензії ліофілізовані клітини дріжджів розводили в 50 мМ ФБ, рН 7,8 (до концентрації 90 – 100 мг·мл<sup>-1</sup>). Суспензію клітин розливали у склянки для гомогенізації, вносили скляні кульки (діаметр 0,45 – 0,5 мм) у кількості 3/4 від об'єму суспензії та заморожували. Клітини руйнували на планетарному гомогенізаторі по 2 хв при 1000 об·хв<sup>-1</sup> при 0 °С. Безклітинні екстракти (БЕ) відокремлювали від уламків клітин центрифугуванням (15 000 об·хв<sup>-1</sup>,  $r_{\text{сер}}=8$  см, 30 хв, 4 °С). Осадки промивали 50 мМ ФБ, рН 7,8, повторно руйнували і центрифугували. У БЕ визначали активність цільового фермента та концентрацію загального білка.

*Стадія 1. Лізис клітинних уламків.* До 2 г клітинних уламків додавали 100 мл 0,1 М лактат натрію у 20 мМ ФБ, рН 7,5; 0,025 мМ ЕДТА; 1 мМ ФМСФ. До отриманої суспензії вносили 1,2 мл 96 % бутанолу із додаванням тритону X-100 до кінцевої концентрації 1 %. Суміш витримували 12 год за температури +4 °С.

Відстояну суміш центрифугували 30 хв за 0 °С та 4000 об·хв<sup>-1</sup> на центрифугу К-23, супернатант відбирали. У БЕ визначали активність цільового фермента та концентрацію загального білка.

*Стадія 3. Йонообмінна хроматографія на ДЕАЕ-метакрилаті.* Безклітинні екстракти наносили на колонку (1,0 x 20 см). Як сорбент використовували ДЕАЕ–метакрилат Toyopearl 650 M (1-7-7, AKASAKA TOKYO, Японія). Зрівноважену колонку промивали 20 мМ ФБ, рН 7,8 (70 мл). Елюцію проводили 15 % (від насичення при 0 °С) сульфатом амонію в буфері 50 мМ ФБ, рН 7,8. При елюції фермента спостерігалось його вимивання із верхнього шару сорбенту у вигляді більш забарвленої зони. Ступінь очищення цільового фермента від баластних білків характеризували, визначаючи його активність у фракціях елюатів, та за допомогою електрофорезу в ПААГ за денатуруючих умов (у присутності SDS).

*Стадія 4. Висолювання ферменту* проводили додаванням до елюату сухого амоній сульфату до 70% (від насичення при 0 °С при контролі рН близько 7,0-7,5). Стабілізований таким чином фермент зберігав свою активність протягом двох місяців за температури - 20 °С.

### **2.3.12. Виділення та очищення DLDH із клітин рекомбінантних дріжджів *O. polymorpha***

За основу схеми виділення DLDH *O. polymorpha* послужив метод, описаний для дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* [134].

Клітини дріжджів трансформанта *O. polymorpha* «tr6» вирощували в колбах при 30 °С на шейкері протягом 62 годин. 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 в кульовому млинку скляними кульками Балотіні. Руйнування відбувалося в ФБ, рН 7,8 без додавання 1 мМ ЕДТА та

1 мМ ФМСФ, оскільки раніше нами було виявлено негативний вплив цих речовин на активність DLDH.

Руйнування клітин проводили за схемою: 1,5 хвилинне руйнування на Вортексі з 6 хв. охолодженням на льоді (повтор процедури - 5 разів). Після цього відбирали БЕ, а до уламків клітин вносили 50 мМ ФБ, рН 7,8 та повторювали руйнування за попередньою схемою. Отриманий БЕ характеризувався активністю DLDH 1,2 Од·мл<sup>-1</sup>. Однак, більш оптимальною виявилась схема, яка включала: 2 хвилинне руйнування на Вортексі та 8 хв. охолодження на льоді (повтор двічі). Активність DLDH у БЕ, за такої схеми фізичного руйнування, становила 2 Од·мл<sup>-1</sup>.

Після отримання БЕ, білки фракціонували осадженням охолодженим 50 % ацетоном та центрифугуванням (30 хв; 2 000 об·хв<sup>-1</sup>; -5 °С). Отриманий осад ресуспендували в 5 мл 50 мМ ФБ, рН 7,5 та 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 7,0-7,5.

„Проскок” і промивні розчини відбирали та визначали в них концентрацію білка та активність DLDH. Збирали фракції об'ємом 3 мл. 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.

### **2.3.13. Дослідження спектрів поглинання ФЦ $b_2$ *O. polymorpha***

Спектри поглинання розчину флавоцитохрому  $b_2$  в нативній формі знімали на спектрофотометрі Shimadzu (Японія) у видимій ділянці світла (300 - 600 нм) в 1 см кварцевих кюветах об'ємом 2 мл.

Підготовку проб для спектрофотометрування здійснювали наступним чином. У відібрану аліквоту (1 мл) розчину ФЦ  $b_2$  з питомою активністю  $12,5 \text{ мкмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ , позбавленого солей шляхом діалізу, вносили 10 мМ фосфатний буфер, рН 7,6 до 2 мл, після чого знімали спектр нативної форми фермента.

## **2.4. Розробка біосенсорного методу аналізу лактату**

### **2.4.1. Конструювання амперометричних лактат-селективних біосенсорів**

Амперометричні біосенсори конструювали на базі стандартних амперометричних потенціостатів за використання трьохелектродної сенсорної конфігурації: срібло-хлорсрібний  $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$  (3 М) використовували як електрод порівняння, як допоміжний використовували стержневий платиновий електрод. Застосовували різні типи робочих електродів: на основі графітових стержнів (RW001, діаметр 3,05 мм, Ringsdorff Werke, Бонн, ФРН), поміщених в скляну трубку і герметично залитих епоксидним клеєм. Перед безпосереднім використанням робочу поверхню графітових електродів полірували на наждачному папері та відмивали водою в ультразвуковій лазні 10-15 хв. У випадку використання 4 мм комерційних золотих планарних електродів C220 «DropSens» (Ріверв'ю, Флорида, США), усі електроди трьохелектродної конфігурації розташовувались на керамічній підкладці.

Амперометричні дослідження проводили за допомогою комерційних амперометричних потенціостатів: "EP 30 Biometra", (Геттінген, ФРН), "Autolab"



(PGSTAT302, Utrecht, Нідерланди), *CHI 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 у рамках науково-технічного проекту «Розробка і виготовлення експериментальних зразків електрохімічних біосенсорів для аналізу формальдегіду в харчових продуктах, фармацевтичних препаратах та довкіллі»), з'єднаних з персональним комп'ютером для реєстрації та обробки результатів. Для вивчення операційної стабільності розроблені сенсори 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 проводились за використання експериментального зразка автоматичної аналізаторної системи «Форматест-2010», розробленої у співпраці із к.т.н. Вусом Б.С.(ТзОВ „ Науково-виробнича фірма „Інженерна Лабораторія” Лтд (Львів, Україна).

#### **2.4.2. Формування біочутливого елемента біосенсора на основі ферментних препаратів, клітинних уламків, субклітинних фракцій та клітин рекомбінантних штамів *O. polymorpha***

Для забезпечення іммобілізації біоелемента (ферментів, клітинних уламків, субклітинних фракцій, збагачених мітохондріями, та пермеабілізованих клітин рекомбінантних штамів *O. polymorpha*) на поверхні робочих електродів було використано різні процедури та методи:

1) Утримання ФЦ  $b_2$  діалізною плівкою: 2-4 мкл ФЦ  $b_2$  (із активністю 19-22 Од·мл<sup>-1</sup>), або 2 мкл суспензії пермеабілізованих клітин *O. polymorpha* (50 мг·мл<sup>-1</sup>) наносили крапельним методом порціями по 1 мкл на поверхню електрода і залишали підсихати при 4 °С протягом 10 хв. Потім, електрод покривали стандартною діалізною мембраною (1x1 см<sup>2</sup>). Для утримання діалізної

мембрани використовували «О»-кільце діаметром 5 мм (для торцевих графітових електродів) або плівка скотчу (у випадку використання планарних електродів). Перед використанням електроди промивали 20 мМ ФБ, рН 7,6.

2) Осадження катодним полімером: 2-4 мкл ФЦ  $b_2$  (з активністю 19-22 Од·мл<sup>-1</sup>) або 2 мкл субклітинних фракцій, збагачених мітохондріями (з активністю фермента 5 од·мл<sup>-1</sup>), чи 2 мкл суспензії пермеабілізованих клітин *O. polymorpha* (50 мг·мл<sup>-1</sup>) наносили крапельним методом на поверхню електрода та підсушували при кімнатній температурі протягом 5 хв. Поверх сформованої біоплівки, наносили 8 мкл розведеного в 10 разів катодного полімеру (GY 83-0270 005; рН 5,5). При цьому відбувалась осадження полімеру і формувалась міцна полімерна плівка, що утримувала біоелемент. Електроди промивали 20 мМ ФБ, рН 7,6 та зберігали при 4°C до їх використання.

3) Утримання ФЦ  $b_2$  шаром електроосаджуваного катодного полімеру: робочу поверхню електродів покривали 1 мкл ФЦ  $b_2$  (з активністю 22 Од·мл<sup>-1</sup>), або 2 мкл суспензії клітинних уламків (питомою активністю фермента 10 Од·мл<sup>-1</sup>), чи 2 мкл суспензії пермеабілізованих клітин *O. polymorpha* (50 мг·мл<sup>-1</sup>) і підсушували при кімнатній температурі 2-4 хв. Сформований біомодифікований шар покривали 20 мкл катодного полімеру (CP9 чи CP-Os) з наступним його електроосадженням. Електроосадження проводили в мініатюризованій електрохімічній комірці, використовуючи потенціостатичні імпульси (10 імпульсів) у такій послідовності: -1200 мВ/0.2 с та 0 мВ/5 с [166, 167]. Після включення ферменту у гель полімеру, електроди промивали 50 мМ ФБ, рН 7,6 та зберігали при 4°C.

### 2.4.3. Амперометричні вимірювання

Амперометричні вимірювання проводили при кімнатній температурі в електрохімічній комірці об'ємом 50 мл, заповненій 25 мл фосфатного буферу,

pH 7,6, при постійному перемішуванні на магнітній мішалці. Біосенсор поміщали в інтенсивно перемішуваний розчин і, після встановлення базового сигналу, в комірку вносили певний аналіт (L- чи D-лактат, можливі інтерферуючі речовини, розведені реальні зразки фармакологічних препаратів, біологічних рідин людини чи харчових продуктів). За допомогою амперометричних потенціостатів реєстрували та обробляли результати вимірювань у в одиницях сили струму.

#### **2.4.4. Сканувальна електрохімічна мікроскопія (SECM)**

Платиновий мікроелектрод діаметром 25 мкм готували на основі платинової нитки Goodfellow (Бад-Наугайм, Німеччина) згідно з процедурою, описаною Ballesteros Katemann [168]. Платинова сітка площею 1,5 см<sup>2</sup> використовувалась як допоміжний електрод, а мініатюрний Ag/AgCl/3 М КСl – як електрод порівняння.

Зразок для SECM-аналізу готували нанесенням на склоподібну Карбонову пластину HTW Hochtemperatur Werkstoff GmbH (Майтінген, Німеччина) 0,1 мкл препарату ФЦ  $b_2$  (із активністю 19 Од·мг<sup>-1</sup> білку). Ферментну краплю покривали катодним полімером (GY 83-02700005), розведеним у десять разів. Для цього використовували тонкий витягнутий скляний мікрокапіляр. Імобілізований таким чином ферментний зразок підсушували при кімнатній температурі протягом декількох хвилин. Імобілізацію ФЦ  $b_2$  на поверхні платинового мікроелектроду діаметром 25 мкм проводили згідно з процедурою, описаною в розділі 2.4.2. Перед використанням ферментно-модифіковані робочі мікроелектроди і зразки з іммобілізованим ферментом промивали 50 мМ фосфатним буфером, pH 7,8.

SECM-дослідження проводили згідно з роботами [169, 170].

## **2.5. Методи синтезу та характеристики золотих наночастинок**

### **2.5.1. Синтез золотих наночастинок (Au-НЧ)**

Синтез Au-НЧ проводили за модифікованим методом [171] наступним чином: до 1,25 мл 1 мМ  $\text{HAuCl}_4$  додавали 0,125 мл 38,8 мМ тринатрій цитрату із подальшим інтенсивним перемішуванням та струшуванням упродовж 15 хв при температурі 100 °С до отримання характерної суміші винно-червоного кольору. Спектри поглинання отриманих наночастинок реєстрували на спектрофотометрі SHIMADZU UV-1650 PC (Кіото, Японія) в діпазоні довжин хвилі 250-800 нм. Перед використанням, Au-НЧ осаджували центрифугуванням при 9700 g на центрифугі Hettich Micro-22R протягом 40 хв.

### **2.5.2. Синтез золотих наночастинок *in situ* на поверхні золотих планарних електродів**

Наношар золота формували на поверхні комерційного 4 мм золотого електроду C220 («DropSens» Ріверв'ю, Флорида, США) шляхом відновлення іонів золота(III) 30 % пероксидом водню [172]. Для прискорення відновлення золота(III), керамічну основу електроду підігрівали протягом 20-30 с на полум'ї запальнички (газового пальника).

### **2.5.3. Сканувальна електронна мікроскопія і рентгеноспектральний аналіз**

Для морфологічного аналізу зразків використовували сканувальний електронний мікроскоп SEM-мікроаналізатор РЕММА-102-02 (Суми, Україна), Зразки наносили на графітову підкладку товщиною 0,05 см, діаметром 0,5 см. Зразки фіксували плівкою, що формувалась розчином Бутварної смоли В-98 (Sigma, St. Louis, MO, USA) у 1,5 % хлороформі за дії ультразвуку на частоті

24 кГц. В експериментах відстань від останньої лінзи мікроскопа до зразка (WD) становила від 21,2 мм до 24,5 мм; напруга прискорювача становила 20 еВ; збільшення було кратне 4000.

#### **2.5.4. Атомно-силова мікроскопія**

Розмір і структуру Au-НЧ досліджували на атомно-силовому мікроскопі P47-PRO (NT-MDT). Аліквоту досліджуваного зразка рівномірно розподіляли на поверхні свіжорозщепленої слюди, висушували і аналізували на повітрі, використовуючи резонансну частоту 160 кГц, швидкість сканування  $1 \text{ Гц}\cdot\text{с}^{-1}$  і роздільну здатність  $256 \times 256$  пікселів.

#### **2.5.5. Трансмісійна електронна мікроскопія**

Морфологічна характеристика Au-НЧ проводилась за використання трансмісійного електронного мікроскопа PEM-100 (Суми, Україна). Спеціальна плівка підкладки виготовлялась на мідній сітці (300 меш) за використання Бутварної смоли В-98 в 1,5 % хлороформі та дії ультразвуку при частоті 24 кГц. На поверхню підкладки крапельним шляхом наносився зразок Au-НЧ.

### **2.6. Біофункціоналізація нано- та мікрочастинок**

#### **2.6.1. Імобілізація ФЦ $b_2$ на поверхні Au-НЧ**

Для функціоналізації синтезованих наночастинок аміногрупами, Au-НЧ осаджували центрифугуванням при 9700 g на центрифугі Hettich Micro-22R протягом 40 хв, промивали 4 рази 5 мМ ФБ, рН 7,5, знову осаджували та вносили 10 мМ водний розчин цистеаміну з подальшою інкубацією протягом ночі при  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Після цього наночастинок відмивали тричі 5 мМ ФБ, рН 7,5 та знову ресуспендували у 100 мкл 5 мМ ФБ, рН 7,5.

Біофункціоналізація модифікованих цистаміном Au-НЧ з концентрацією 0,17 мМ проводилась шляхом додавання очищеного ФЦ  $b_2$  з питомою активністю 22 Од·мл<sup>-1</sup> до модифікованих НЧ у співвідношенні 2:1. Суміш інкубували при 4 °С протягом ночі. Біофункціоналізовані наночастинки (ФЦ  $b_2$ -Au-НЧ) промивали тричі 5 мМ ФБ, рН 7,5. Осадження ФЦ  $b_2$ -Au-НЧ здійснювали шляхом центрифугування при 9700 g протягом 20 хв. На різних етапах біофункціоналізації проводився аналіз ферментативної активності ФЦ  $b_2$ .

### **2.6.2. Імобілізація ФЦ $b_2$ на поверхні феромагнітних мікрочастинок**

Для імобілізації ФЦ  $b_2$  за принципом іонних взаємодій використовувались комерційні магнітні мікрочастинки «BioMag<sup>®</sup> Plus particles» на основі оксиду заліза, розміром 1 мкм, покриті силаном та функціоналізовані аміногрупами (“Micro particles, magnetic, amino functionalized, Sigma-Aldrich”).

Суспензію магнітних мікрочастинок концентрацією 50 мг·мл<sup>-1</sup> при рН 7,0 розводили до кінцевої концентрації 1,5 мг·мл<sup>-1</sup> та вносили рівний об'єм очищеного препарату фермента з активністю 3,75 Од·мл<sup>-1</sup> та концентрацією білка 1,5 мг·мл<sup>-1</sup>. Отриману суспензію загальним об'ємом 400 мкл інкубували протягом 1,5 год. при + 8 °С для імобілізації фермента на магнітному носії. Після інкубації, біофункціоналізовані магнітні мікрочастинки осаджували в магнітному полі та двічі промивали 50 мМ фосфатним буфером рН 7,5. Ефективність зв'язування ФЦ  $b_2$  на комерційних феромагнітних мікрочастинок оцінювали за активністю фермента (за температури 30 °С) на різних стадіях імобілізації.

### **2.7. Статистичний аналіз експериментальних даних**

Досліди проводились у чотирьох-шести повторах. Для кожної вибірки показників визначали середнє арифметичне значення (M) та стандартне

відхилення ( $\sigma$ ). 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 кореляції  $R$  та рівень достовірності зв'язку  $p$  (для події  $R = 0$ ). Вказані параметри та статистичні показники наведені в рисунках та таблицях.

### РОЗДІЛ 3

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Лактатна (молочна) кислота є універсальним метаболітом майже всіх живих організмів і природним компонентом багатьох харчових продуктів, зокрема молочних, та вин, а також харчовим консервантом. Моніторинг лактату є необхідним у виноробстві, пивоварінні, молочній галузі харчової промисловості, а також для контролю якості продуктів, які містять солі лактату або саму молочну кислоту як рН-стабілізуючу та консервуючу добавку. Багато косметичних, фармацевтичних препаратів, миючих та дезинфікуючих засобів також містять лактат.

За рівнем молочної кислоти в крові діагностують діабет, гіпоксію, ацидоз, деякі гострі серцево-судинні захворювання, тестують рівень токсичності ліків. Аналіз цього метаболіту в крові спортсменів використовують для моніторингу фізичного навантаження з метою забезпечення оптимальних тренувальних режимів [173].

Найчастіше для аналізу лактату використовують ензиматичні підходи із використанням  $\text{NAD}^+$ -залежної лактатдегідрогенази (ЛДГ) із м'язів ссавців (КФ 1.1.1.27) та бактерійної лактатоксидази (ЛО) (КФ 1.13.12.4). Методика визначення базується на ензиматичному окисненні лактату до пірувату ферментами ЛДГ або ЛО із наступним спектрофотометричним визначенням  $\text{NADH}$  чи колориметричним моніторингом пероксидазного окислення хромогену.

Крім описаних вище, відомі ще два ферменти, що беруть участь у метаболізмі лактату у дріжджів - 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 кодуються генами *CYB2* і *DLD1*, відповідно. ФЦ  $b_2$ , отриманий із *S. cerevisiae* та *Hansenula anomala*, - гомотетрамер, кожна



субодиниця якого містить по одній молекулі флавінмононуклеотиду і протогему IX. DLDH – це ФАД- та  $Zn^{2+}$ -вмісний гомодимер. ФЦ  $b_2$  та DLDH завдяки своїм унікальним каталітичним властивостям (абсолютна специфічність до енантіомерів лактату, відсутність у потребі екзогенного кофактора) мають важливе біоаналітичне значення, оскільки здатні замінити  $NAD^+$ -залежну ЛДГ м'язів ссавців або бактерійну ЛО при визначенні вмісту лактату в біологічних рідинах та харчових продуктах за допомогою ензиматичних та біосенсорних підходів.

Широке використання ФЦ  $b_2$  і DLDH із *S. cerevisiae* у біоаналітиці гальмується вираженою лабільністю ферментів та труднощами їх виділення в активному стані. Саме тому в завдання дисертаційної роботи входило генно-інженерне конструювання штамів – продуцентів ФЦ  $b_2$  та DLDH на основі *Ogataea polymorpha* для отримання відповідних білків з підвищеною стабільністю, дослідити особливості регуляції синтезу ферментів рекомбінантними штамми, розробити прості і ефективні методи виділення та очистки ферментів із відібраних продуцентів та створити нові біоаналітичні підходи для визначення L- та D-лактату з використанням цих ферментів.

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

Надекспресія генів полегшує отримання високоочищених препаратів цільових ферментів та дозволяє покращити їх біоаналітичні характеристики. Окрім того, надекспресія одного з генів із одночасною делецією гена, що кодує фермент, здатний окислювати альтернативний стереоізомер, створює передумови для отримання дріжджових клітин, перспективних для розробки високоселективних мікробних біосенсорів та аналітичних наборів. Нами було

поставлено за мету клонування генів L-та D-лактат:ферицитохром c-оксидоредуктаз (*CYB2* і *DLDH1*) дріжджів *O. polymorpha*, забезпечення їх надекспресії в гомологічних клітинах і відбір рекомбінантних штамів із найвищою питомою активністю цільових ферментів.

### 3.1.1. Генно-інженерне конструювання штамів – продуцентів ФЦ *b<sub>2</sub>* *O. polymorpha*

У роботі використовувались штами колекції Інституту біології клітини НАН України: *Ogataea polymorpha* 356 лінії DL1, *O. polymorpha* CBS 4732, *O. polymorpha* C-105 (*gcr1 catX*) [174]. У вихідного штаму C-105 порушено глюкозну катаболітну репресію [175], що забезпечує конститутивне функціонування промотора алкогольоксидази, а також пошкоджено ген каталази, що полегшує виділення цільового фермента без домішок каталази [160]. Для конструювання і ампліфікації плазмід використовували штам *E. coli* DH5α [156].

Послідовність нуклеотидів гена *CYB2* *O. polymorpha* була отримана із бази даних Rhein Biotech GmbH (Düsseldorf, Germany). Відкриту рамку трансляції (BPT) гена *CYB2* *O. polymorpha* разом із термінатором ізолювали за допомогою ПЛР, використовуючи праймери Sm1 (5'-CCC AAG CTT ATG TGG AGA ACC TCC TAT AG-3')/Sm2 (5'-CCC GGT ACC GGA TCC CAA AAT AGA GCG CAA GAT TGC-3') 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 [150], заміщуючи термінатор гена *AOX*. В результаті, плазміда отримала назву рНІРХ2\_СУВ2 (Рис. 3.1, А). Касету експресії, що містить промотор гена *AOX* і BPT *CYB2* з термінатором ампліфікували за допомогою ПЛР, використовуючи праймери Sm3 (5'-TGT GGA TCC TCG TTT AGA ACG TCC TG-3')/Sm2 і вектор рНІРХ2\_СУВ2 як матрицю. ПЛР-продукт, попередньо оброблений рестриктазою *Bam*HI,

клонували у вектор рGLG61 [151]. Сконструйована плазміда отримала назву рGLG61\_CYB2 (Рис. 3.1, Б).

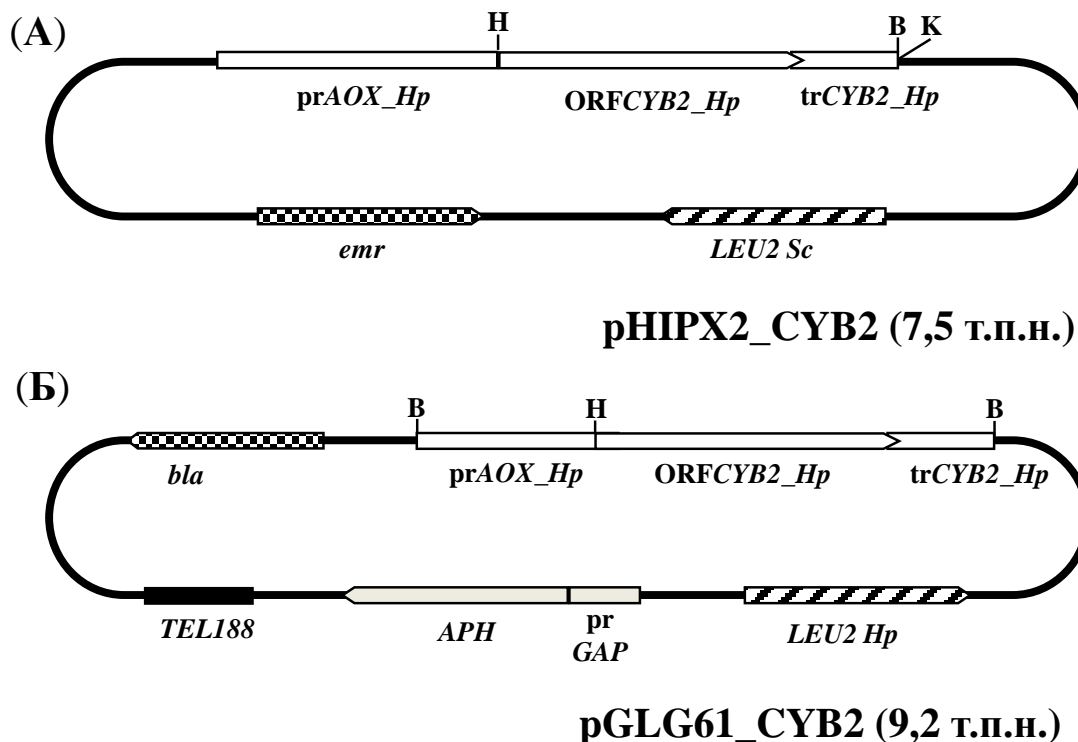


Рис. 3.1. Фізична карта плазмід рHIPX2\_CYB2 (7,5 т.п.н.) (А) і рGLG61\_CYB2 (9,2 т.п.н.) (Б). Касета експресії, що містить промотор гена *AOX*, ВРТ гена *CYB2* і термінатор *CYB2 O. polymorpha*, позначена білою лінією. Гени *LEU2 S. cerevisiae* або *O. polymorpha* позначені заштрихованою лінією. Гени *emr* і *bla* – забезпечують резистентність до еритроміцину і ампіциліну, позначені лінією в клітинку. Ген *APH*, що забезпечує стійкість до генетицину, поєднаний із ослабленим конститутивним промотором гена гліцеральдегідфосфатдегідрогенази (*GAP*), позначений сірою лінією. ARS-елемент *HARS36 (TEL188)* – чорною лінією. Сайти рестрикції: H- *Hind*III, B – *Bam*HI, K – *Kpn*I.

Експресію генів дріжджів можна суттєво підвищити шляхом множинної інтеграції цільових нуклеотидних послідовностей [176, 177]. Плазміда рGLG61

містить домінантний маркер – бактерійний ген *APH* (аміноглікозид-3-фосфотрансфераза), експресія котрого ослаблена, 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 [151].

Плазмиду pGLG61\_CYB2, сконструйовану на основі вектора pGLG61 (3.1, 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<sup>-1</sup>. 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 праймери Sm3/Sm2 і хромосомну ДНК стабільних трансформантів у ролі матриці. Було отримано фрагменти очікуваної довжини ~ 3.3 т.п.н. (Рис. 3.2).

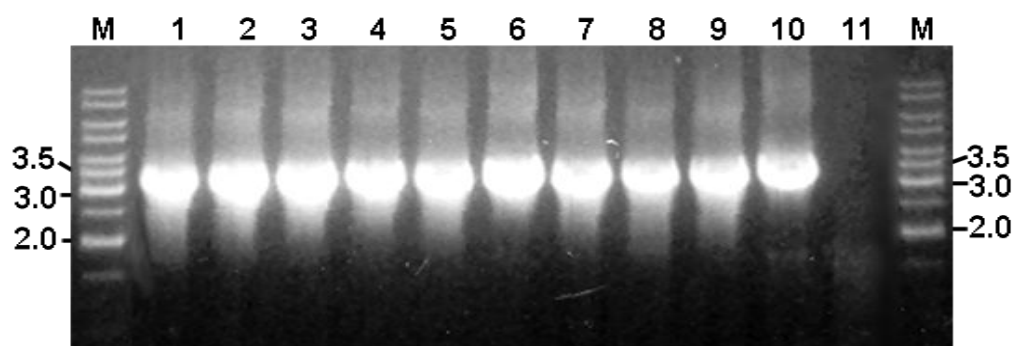


Рис. 3.2. Електрофореграма ПЛР-аналізу стабільних трансформантів штаму C-105 *O. polymorpha* плазмідною pGLG61\_CYB2. 1-9 - стабільні трансформанти, 10 і 11 – позитивний (плазміда pGLG61\_CYB2) і негативний (хромосомна ДНК штаму C-105) контролі, відповідно. М – маркери молекулярної маси фрагментів (величини фрагментів подані в т.п.н.).

### 3.1.2. Скринінг генетицин-резистентних трансформантів із підвищеною активністю ФЦ $b_2$

Первинний скринінг генетицин-резистентних трансформантів з підвищеною активністю ФЦ  $b_2$  проводився за допомогою опрацьованого нами методу візуалізації ферментативної активності пермеабілізованих клітин на чашках Петрі [164]. Для цього суспензію клітин, попередньо вирощених на 1 % сахарозі, наносили крапельним методом на 2 % агаризоване середовище з 1 % глюкозою. Після інкубації клітин протягом 14 год при 37 °С, чашки заливали розчином пермеабілізуючого агента (цетилтриметиламонійбромід, 3 мг·мл<sup>-1</sup>) в 50 мМ фосфатному буфері, рН 8,0 з додаванням 1 мМ фенілметансульфонілфториду (ФМСФ) і 1 мМ EDTA. Пермеабілізацію проводили протягом 10 хв при 30°C. Клітини, відмиті від пермеабілізуючого реагента, інкубували 15 хв в реакційній суміші, що містила: 50 мМ фосфатний буфер рН, 8,0; 1 мМ ФМСФ; 1 мМ EDTA; 0.83 мМ  $K_3Fe(CN)_6$ ; 100 мМ L-лактат. Візуалізацію активності ФЦ  $b_2$  пермеабілізованих клітин проводили у присутності 20 мМ розчину  $FeCl_3$  в 100 мМ HCl 3-5 хв. При позитивному тесті, пермеабілізовані клітини набували синє забарвлення різної інтенсивності, що прямо залежить від рівня активності ФЦ  $b_2$  (Рис. 3.3, Б).

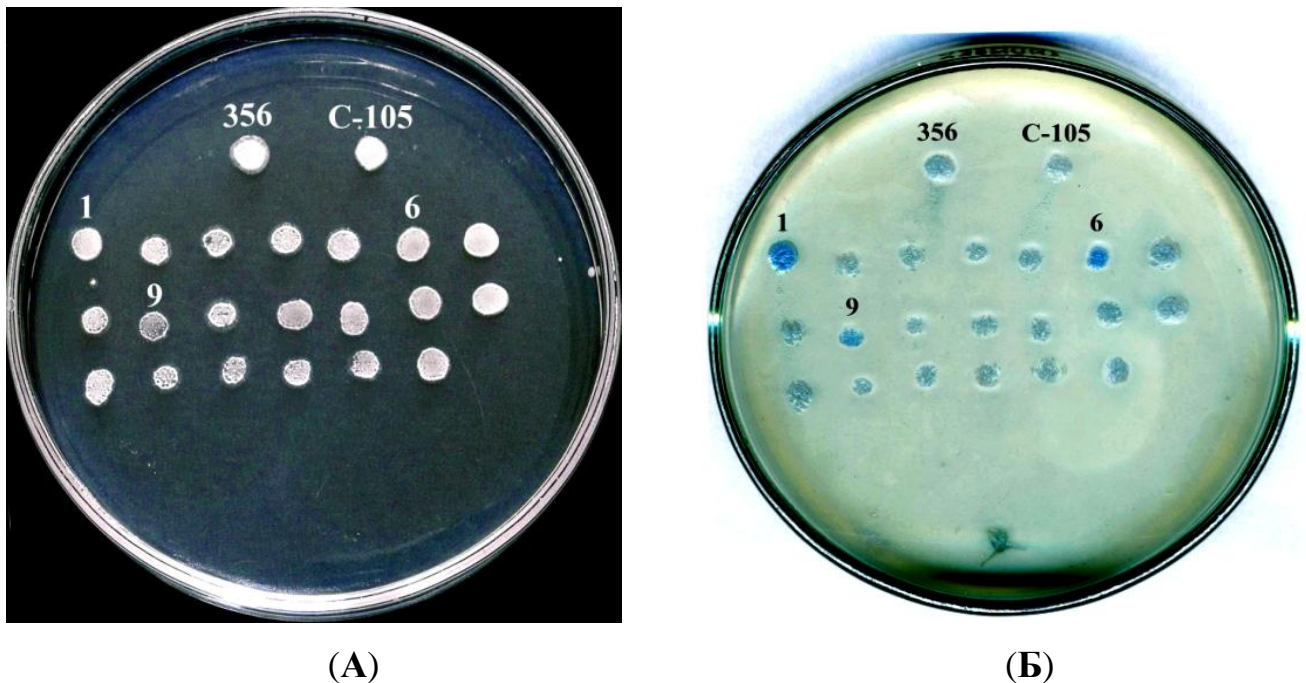


Рис. 3.3. Фотографії чашок Петрі з результатами скрінінгу трансформантів – продуцентів ФЦ  $b_2$ . Пермеабілізовані колонії трансформантів (А). Колонії трансформантів після проведення візуалізації ферментативної активності (Б). 356 - штам дикого типу, С-105 – вихідний штам, «1», «6», «9» - трансформанти із підвищеною активністю ФЦ  $b_2$ .

Найбільш інтенсивно забарвлені колонії (трансформанти «1», «6», «9») відбирались із матричної чашки для більш детального дослідження.

### 3.1.3. Генно-інженерне конструювання штамів – продуцентів DLDH *O. polymorpha*

Стереоселективний до D-лактату флавоцитохром термотолерантних метилотрофних дріжджів *O. polymorpha* кодується геном *DLD1*. Конструювання дріжджового надпродуцента D-лактат : цитохром *c* оксидоредуктази (DLDH) *O. polymorpha* «tr6» (*gcr1 catX cyb2Δ/DLD1*) 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*), що характеризується порушенням глюкозної катаболітної репресії та відсутністю каталазної активності. 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 пару праймерів Ko258 / Ko259 і хромосому ДНК штаму *O. polymorpha* *NCYC 495* (*leu1-1*) як матрицю. Ампліфікація 3'-некодуючої ділянки гена *CYB2* (~1,0 т.п.н.) проводилась за використання пари праймерів Ko260 / Ko261. Обидва фрагменти було поєднано за допомогою ПЛР, використовуючи праймери Ko258 / Ko261, оброблено ендонуклеазами рестрикції *KpnI* та *HindIII* і клоновано у відповідні сайти плазмиди pUC57 (Fermentas, Вільнюс, Литва). Сайти рестрикції *KpnI* та *HindIII* були введені в праймери для спрощення клонування (див. розділ 2.2.2).

За допомогою пари праймерів VA158 / VA159 та плазмиди pPICZ-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 *PstI*-фрагмент між 5'- та 3'-некодуючими ділянками гена *CYB2*. Сконструйована плазіда отримала назву pLR\_cyb2\_Z (~ 6.2 т.п.н.). Нуклеотидну послідовність клонованого гена перевірено шляхом секвенування (Рис. 3.4, А).

Ген *DLD1* *O. polymorpha* з термінаторною ділянкою ([scaffold\\_7:338354-340365](#) у базі даних геному *O. polymorpha* [178] та промотор гена *AOX* ампліфікували з геномної ДНК штаму *O. polymorpha* *NCYC 495 leu1-1*, використовуючи відповідні пари праймерів: Ko248 / Ko249 і Ko184 / Ko247. Праймери Ko184 та Ko249 використовували для отримання фрагмента розміром ~ 3,0 т.п.н., що містить ген *DLD1* *O. polymorpha*, під промотором гена



алкогольоксидази. Послідовність (His)<sub>6</sub>-tag була введена після ATG кодону відкритої рамки зчитування гена *DLD1* для полегшення одностадійної очистки DIDH. Ориманий фрагмент обробляли ендонуклеазою рестрикції *Vam*HI та клонували у *Vam*HI-лінеаризовану та дефосфорильовану плазмиду pGLG61 [151], внаслідок чого було отримано рекомбінантну плазмиду pGLG61\_DLD1\_Hp (Рис. 3.4, Б).

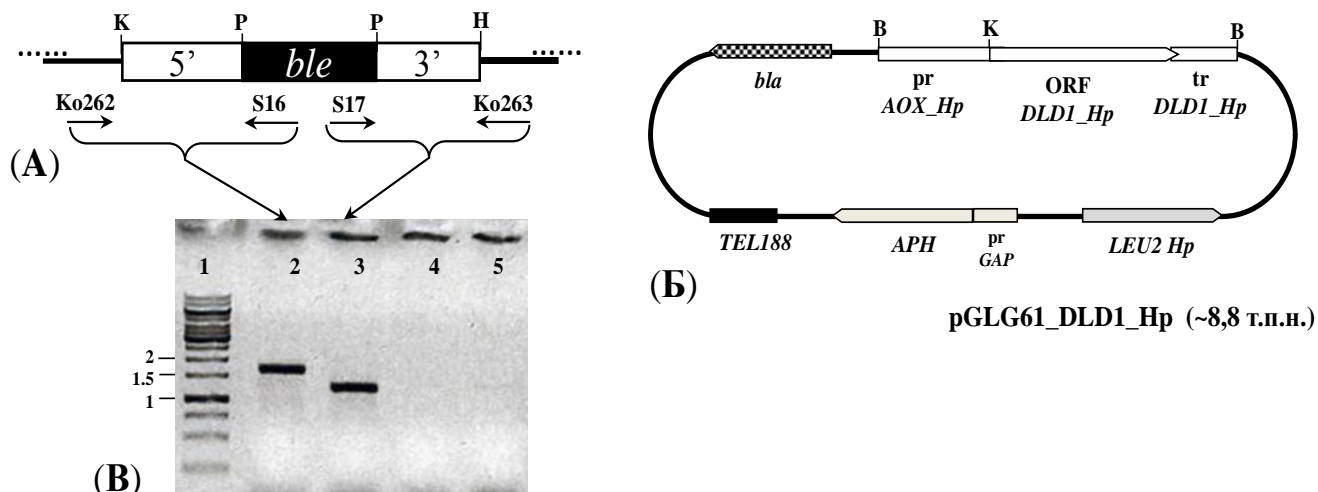


Рис. 3.4. (А) (А) Схема делеційної касети *CYB2*. Ко262, S16, S17, Ко263 – праймери. (Б) Фізична карта плазмиди pGLG61\_DLD1\_Hp (~ 8,8 т.п.н.). Промотор алкогольоксидази (*HpAOX*) та відкрита рамка трансляції (ORF) *DLD1* з термінатором представлено білою лінією. Ген *LEU2 O. polymorpha* – сірою лінією. 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 *sub2Δ*. Маркери молекулярної маси наведено в т.п.н. (лунка 1), лунки 2 та 3 – фрагменти ПЛР, ампліфіковані парою праймерів Ко262 / S16 та S17 / Ко263 з геномної ДНК штаму *sub2Δ*, лунки 4 та 5 – ампліфікація за допомогою тих же пар праймерів за використання геномної ДНК вихідного штаму С-105 як контроль.



Рекомбінантна плазміда pGLG61\_DLD1\_Hp, отримана з pGLG61 (Рис. 3.4, Б), була введена у штам-реципієнт *O. polymorpha* C-105 (*cyb2Δ gcr1 catX*). Отримані трансформанти вирощували на середовищі YPD у присутності підвищених концентрацій G418. Найвища концентрація G418, яка дозволила трансформантам рости, становила 1 мг·мл<sup>-1</sup>. 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, використовуючи праймери Ko184/Ko249 та геномну ДНК стабільних трансформантів як матрицю. Було отримано фрагменти очікуваного розміру (~ 3,0 т.п.н.) (дані не представлено).

Сконструйовані рекомбінантні штами *O. polymorpha*, що експресують *DLD1*, і батьківські штами *cyb2Δ* та C-105, аналізували біохімічно. Активність ФЦ *b<sub>2</sub>* у штаммах *cyb2Δ* та *cyb2Δ/DLD1* не промірялась, що зумовлено делецією гена *CYB2*. Питома активність D1DH у штамі *cyb2Δ/DLD1* була у 6 разів вищою порівняно з батьківським штамом *cyb2Δ* та вихідним штамом C-105, і становила 1,82 Од·мг<sup>-1</sup> (Табл. 3.1.).

Табл. 3.1.

Питома активність ФЦ *b<sub>2</sub>* та D1DH у вихідного та сконструйованих штаммах

Штами	Питома активність, Од·мг <sup>-1</sup>	
	ФЦ <i>b<sub>2</sub></i>	D1DH
C-105	0,27±0,01	0,30±0,02
<i>cyb2Δ</i>	нп.*	0,29±0,01
<i>cyb2Δ/DLD1</i>	нп.*	1,82±0,09

\*нп. – не проявляється

Отже, сконструйований штам *cyb2Δ/DLD1 O. polymorpha* характеризується підвищеною у 6 разів активністю DLDH та відсутністю активності ФЦ  $b_2$ .

#### **3.1.4 Підсумки**

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.

Результати досліджень, описані в розділі 3.1, опубліковано в статтях [181, 183-185, 190].

### **3.2. Оптимізація умов для надсинтезу L- та D-лактат:ферицитохром c-оксидоредуктаз рекомбінантними штамми дріжджів**

Для оптимізації умов синтезу L-та D-лактат:ферицитохром c-оксидоредуктаз (ФЦ  $b_2$  та DLDH) сконструйованими рекомбінантними штамми дріжджів, необхідно було дослідити вплив компонентів поживного середовища та умов культивування клітин для забезпечення максимальної продукції цільових ферментів.

#### **3.2.1. Оптимізація умов синтезу ФЦ $b_2$ клітинами надпродуцента *O. polymorpha* «tr1» (*gcr1 catX CYB2*)**

Оптимізація складу поживного середовища для максимальної продукції ФЦ  $b_2$  клітинами відібраних трансформантів («1», «6» та «9») проводилась з урахуванням оптимальних умов індукції гена *AOX* у вихідному реципієнтному

штамі *O. polymorpha* C-105 (*gcr1 catX*). У даного штаму порушена катаболітна репресія, внаслідок чого в середовищі з глюкозою спостерігається конститутивний синтез ФЦ  $b_2$  під контролем промотора *AOX*. Крім того, раніше показано, що максимальна експресія *AOX* для даного штаму відбувається на синтетичному середовищі, що містить досить високу концентрацію дріжджового екстракту (ДЕ) – 0,2 % [160]. З урахуванням цього факту, визначали активність ФЦ  $b_2$  у трансформантів і вихідного штаму при вирощуванні дріжджів на середовищі з 1 % глюкозою (Glc) або суміші 1 % Glc і 0,2 % L-лактату (Lact), що містить 0,2 % ДЕ. Активність ФЦ  $b_2$  відібраних штамів при культивуванні на різних вуглецевих субстратах досліджено шляхом кількісного визначення активності фермента в безклітинних екстрактах (Рис. 3.5).

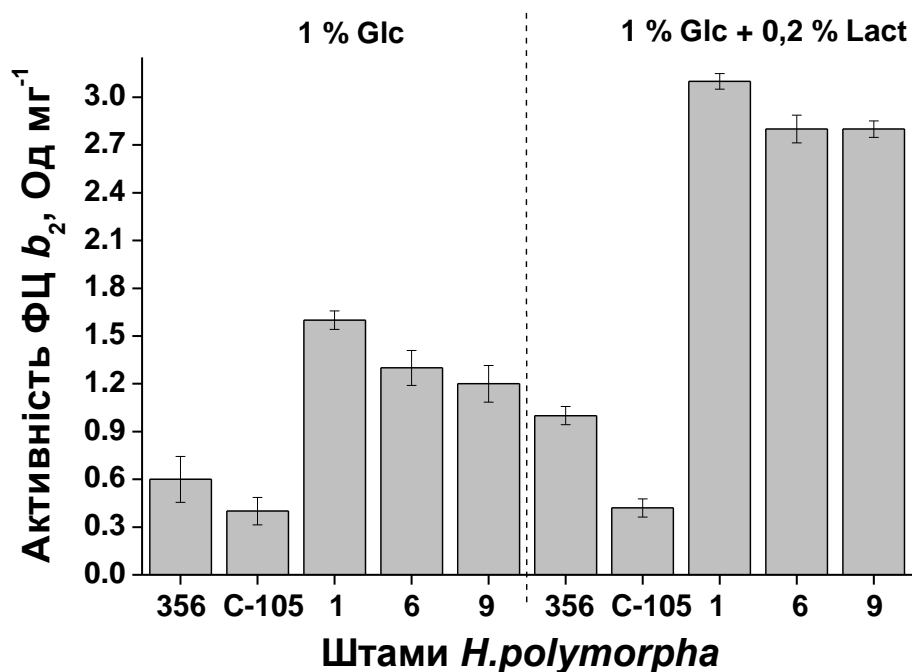


Рис. 3.5. Питома активність ФЦ  $b_2$  в безклітинних екстрактах вихідних штамів (356 і C-105) та відібраних трансформантів («1», «6», «9») вирощених на різних вуглецевих субстратах: 1 % Глюкоза (Glc) та суміш 1% Glc та 0,2 % L-лактату (Lact)

Питома активність ФЦ  $b_2$  у трансформантів, вирощених у середовищі з 1 % Glc, становила 1,2 – 1,6 мкмоль·хв<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> білка і перевищувала активність ферменту у вихідного штаму С-105 у 3-4 рази (0,4 мкмоль·хв<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> білка) (Рис. 3.5). При вирощуванні клітин дріжджів на суміші 1 % Glc і 0,2 % Lact активність ферменту у трансформантів становила 2,8 – 3,1 мкмоль·хв<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> білка, тоді як у вихідного штаму С-105 – 0,38 мкмоль·хв<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> білка. Різниця в активності ферменту становила 4,7-5,2 рази. Підвищення активності ФЦ  $b_2$  у всіх штамів при рості в середовищі з лактатом пояснюється індукуючим впливом останнього на експресію власного гена *CYB2* [27]. Таким чином, середовище, що містить 1 % Glc і 0,2 % Lact є оптимальним для максимальної продукції трансформантами активної форми флавоцитохрому  $b_2$ . Залежність активності ФЦ  $b_2$  трансформанта «1» і вихідного штаму С-105 від фази росту дріжджів представлено на Рис. 3.6.

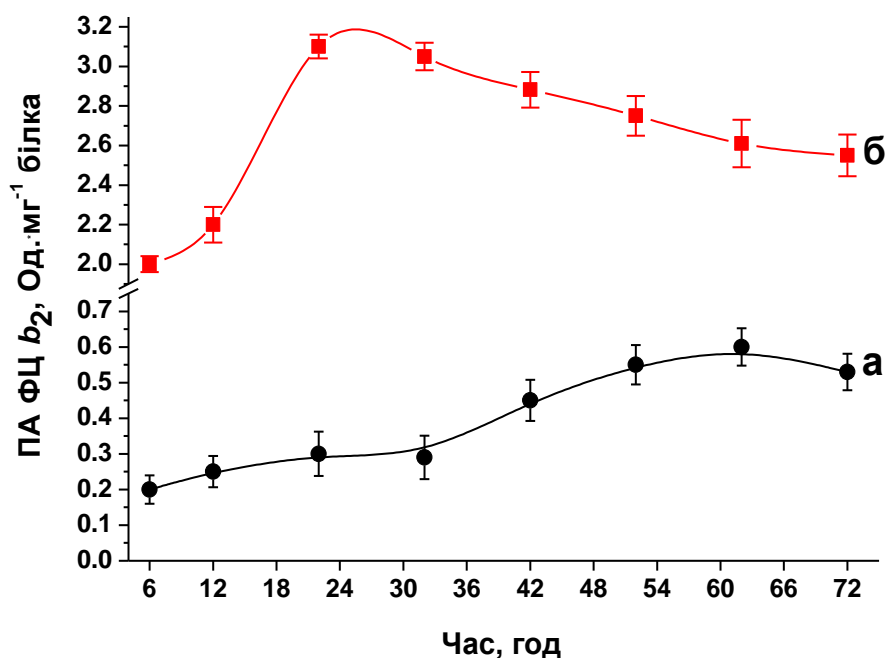


Рис. 3.6. Профіль активності ФЦ  $b_2$  у безклітинних екстрактах вихідного штаму С-105 (а) та трансформанта «1» (б) в динаміці росту дріжджів.

Максимальне значення активності ферменту в безклітинних екстрактах штаму С-105 припадає на 62-у годину росту клітин, що збігається з періодом інтенсивного засвоєння L-лактату клітинами дріжджів [179]. У трансформанта «1», пік активності ФЦ  $b_2$  відповідає 24-й годині росту клітин. Отримані результати добре узгоджуються з даними щодо динаміки активності АОХ в клітинах *O. polymorpha* К-105. Так, при рості на аналогічному середовищі, пік активності АОХ спостерігався в той же період росту клітин (24-40 години) [180]. До цієї фази, дріжджі *O. polymorpha* повністю засвоюють глюкозу із середовища. Можливо, зниження концентрації глюкози в середовищі призводить до енергетичного ослаблення синтезу ФЦ  $b_2$  (Рис. 3.6).

### **3.2.2. Оптимізація синтезу DLDH клітинами надпродуцента *O. polymorpha* «tr6» (*gcr1 catX cyb2Δ/DLD1*)**

Стереоселективний до D-лактату флавоцитохром термотолерантних метилотрофних дріжджів *O. polymorpha* кодується геном *DLD1*. На попередніх етапах досліджень нами сконструйовано дріжджовий надпродуцент D-лактат: цитохром *c* оксидоредуктази (DLDH) *Ogataea polymorpha* «tr6» (*gcr1 catX cyb2Δ/DLD1*). Конструювання штаму 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*), який характеризується порушенням глюкозної катаболітної репресії та відсутністю каталазної активності. Далі, гомологічний ген *DLD1*, у складі плазмиди для мультикопійної інтеграції, надекспресовано в штамі *cyb2Δ* під контролем сильного конститутивного промотора гена АОХ. Одержаний рекомбінантний штам характеризується шестикратним синтезом DLDH, у порівнянні з вихідним штамом [181].

Оптимізація складу поживного середовища для максимального синтезу DLDH рекомбінантним штамом *O. polymorpha* «tr6» проводилась із врахуванням оптимальних умов індукції промотора гена *AOX* у вихідному реципієнтному штамі *O. polymorpha* C-105 (*gcr1 catX*). У цього штаму пошкоджена катаболітна репресія, внаслідок чого, у середовищі із глюкозою спостерігається конститутивний синтез DLDH під контролем промотора *AOX*. Окрім того, відомо, що максимальна експресія *AOX* для цього штаму відбувається на середовищі із концентрацією дріжджового екстракту понад 0,2 % [160]. Із врахуванням цього факту, у середовище Беркгольдера із вмістом дріжджового екстракту 0,5 % вносили різні джерела Карбону та енергії.

Окрім глюкози, як джерело Карбону та енергії було використано етанол і гліцерол (Рис. 3.7).

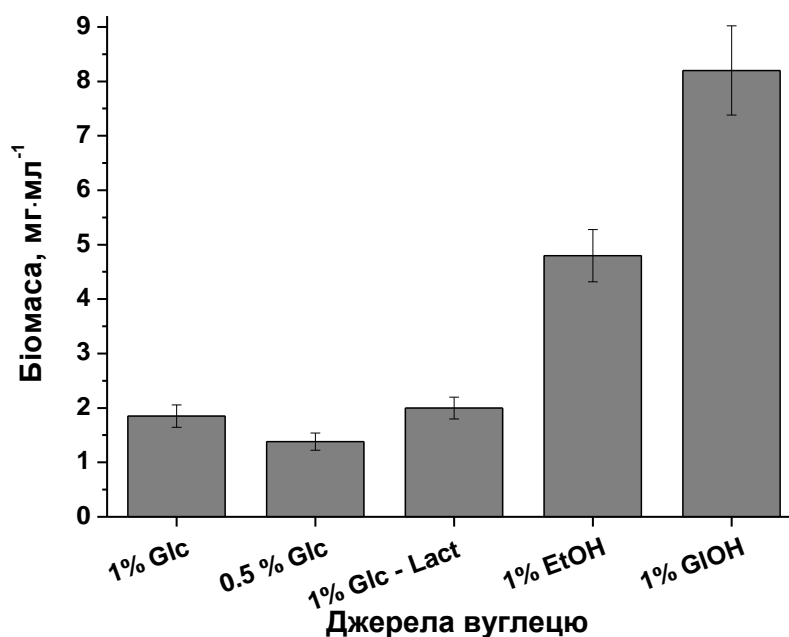


Рис. 3.7. Ріст клітин штаму *O. polymorpha* «tr6» при вирощуванні на різних джерелах Карбону при 30 °С з додаванням 0,5 % рацемату лактату. Скорочення: Glc – глюкоза; Lact – рацемат лактату; EtOH – етанол; GIOH – гліцерол.

Аналіз росту біомаси штаму «tr6» показує, що клітини дріжджів найкраще ростуть у середовищі з 1 % Glc і 0,5 % рацематом лактату, досягаючи значення біомаси 8,2 мг·мл<sup>-1</sup>. Удвічі нижчою є біомаса клітин при використанні 1 % EtOH з 0,5 % рацематом лактату. На середовищі з концентраціями глюкози 1,0 і 0,5 %, із доданням або відсутністю рацемату лактату, накопичення біомаси в 4 рази нижче, ніж на середовищі з 1 % гліцеролом.

Наступним кроком було виявлення середовища, на якому спостерігається найвища питома активність DLDH і найнижча неспецифічна (незалежна від D-лактату) фериціанідредуктазна активність. Для цього проведено пермеабілізацію попередньо відмитих клітин та отримано «тіні» клітин, в яких визначали специфічну та неспецифічну активності ферменту (Рис. 3.8).

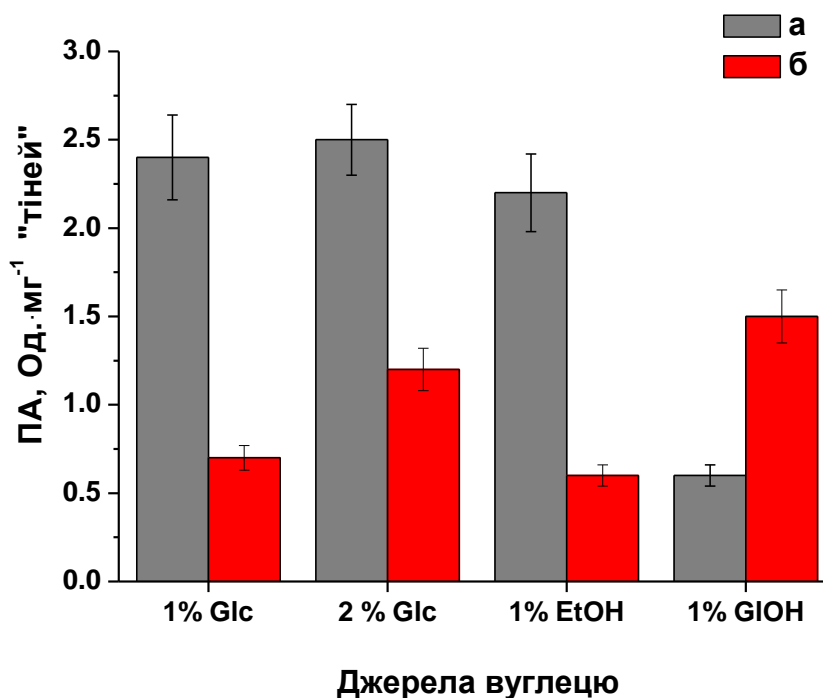


Рис. 3.8. D-лактат-залежна (а) та неспецифічна (б) фериціанідредуктазна активності пермеабілізованих клітин *O. polymorpha* «tr6» при вирощуванні на різних джерелах Карбону з додаванням 0,5 % рацемату лактату. Скорочення: Glc – глюкоза; Lact – рацемат лактату; EtOH – етанол; GlcOH – гліцерол.

Найнижча неспецифічна фериціанідредуктазна активність спостерігається у «тінях» клітин, вирощених у середовищі з 1 % EtOH і 0,5 % рацематом лактату, а специфічна D-лактатдегідрогеназна активність є лише в 1,1 раза нижчою, порівнюючи з клітинами, вирощеними на середовищі з 0,5 – 1 % Glc (Рис. 3.8). Саме тому середовище, яке містить 1 % EtOH і 0,5 % рацемат лактату, обрано як оптимальне для вирощування клітин штаму з метою виділення ферменту.

Досліджено також вплив деяких двовалентних металів та хелатора ЕДТА на активність DLDH у пермеабілізованих клітинах *O. polymorpha* «tr6» (Табл. 3.2).

Табл. 3.2.

Вплив преінкубації пермеабілізованих клітин *O. polymorpha* «tr6» з металами або хелатуючим агентом ЕДТА (у концентраціях 1 мМ) на активність DLDH та неспецифічну фериціанідредуктазну активність. Наведено дані для типового експерименту

	Контроль	ЕДТА	Mg <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>
Специфічна активність DLDH, Од.·мг <sup>-1</sup>	1,9	1,5	2,5	2,3	3
Неспецифічна активність, Од.·мг <sup>-1</sup>	1,7	1,4	2	1,3	1,3

Як видно з Табл. 3.2, хелатуючий агент ЕДТА на 23 % знижує активність DLDH в пермеабілізованих клітинах дріжджів, порівнюючи з контролем. У той же час, іони Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> та Zn<sup>2+</sup> позитивно впливають на активність DLDH, підвищуючи її відносно контролю на 32, 21 та 58 %, відповідно.



З огляду на значний активуючий ефект іонів  $Zn^{2+}$  та  $Fe^{2+}$  на активність DLDH, було проведено експеримент із додатковим внесенням цих металів (у кінцевій концентрації 1 мМ) в поживне середовище для нарощення культури *O. polymorpha* «tr6» (Рис. 3.9).

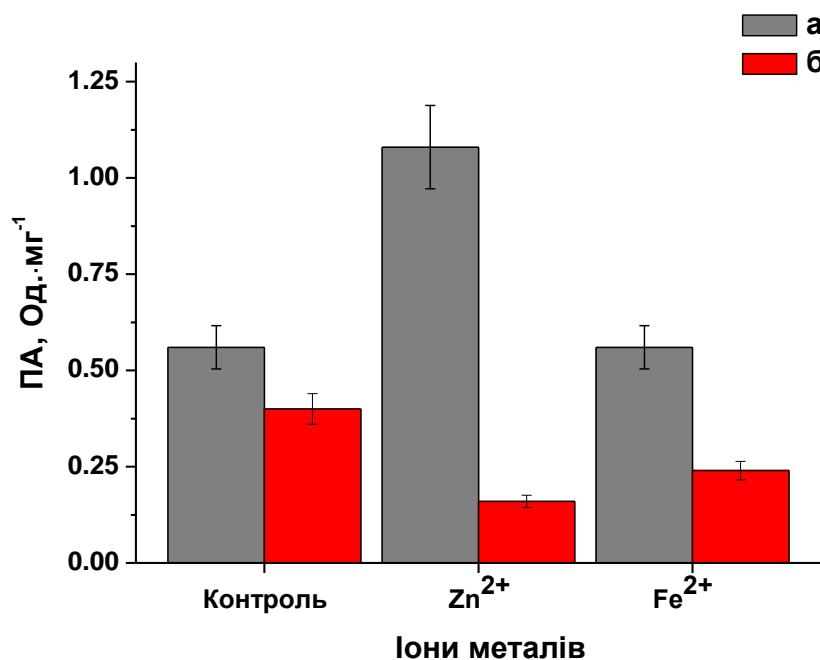


Рис. 3.9. D-лактат-залежна (а) та неспецифічна фериціанідредуктазна (б) активності у безклітинних екстрактах дріжджів *O. polymorpha* «tr6» при вирощуванні за присутності солей  $Zn^{2+}$  та  $Fe^{2+}$  (кінцева концентрація 1 мМ).

Із Рис. 3.9 видно позитивний вплив на специфічну DLDH-активність клітин штаму «tr6» дріжджів *O. polymorpha* додаткового внесення у поживне середовище  $Zn^{2+}$  та  $Fe^{2+}$ . Можливо, іони  $Zn^{2+}$  та  $Fe^{2+}$  репресують синтез неспецифічних фероредуктаз в клітинах дріжджів.

Оскільки штам *O. polymorpha* «tr6» сконструйовано за використання сильного промотора гена алкогольоксидази, додавання метанолу (MeOH) могло б сприяти посиленню експресії гена *DLDI*. Для з'ясування індукуючого впливу

метанолу на синтез DLDH було використано середовище з додаванням метанолу та контрольне середовище без додавання цього Карбонового субстрату. Кожні 8 годин відбирались аліквоти клітин (експеримент і контроль), клітини відмивали, використовуючи стандартну процедуру. Опісля, відмиті клітини зберігали при  $-20^{\circ}\text{C}$  до процедури визначення активностей алкогольоксидази (АО) і DLDH. Для визначення активностей цільових ферментів було здійснено пермеабілізацію за допомогою цетилтриметиламоній броміду (ЦТАБ), концентрація отриманих «тіней» клітин становила  $20\text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ .

Дослідження профілю активності D-лактатдегідрогенази (DLDH) і АО штаму *O. polymorpha* «tr6» при рості на середовищі з 2 % глюкози з додаванням і за відсутності 0,5 % метанолу наведено на Рис. 3.10.

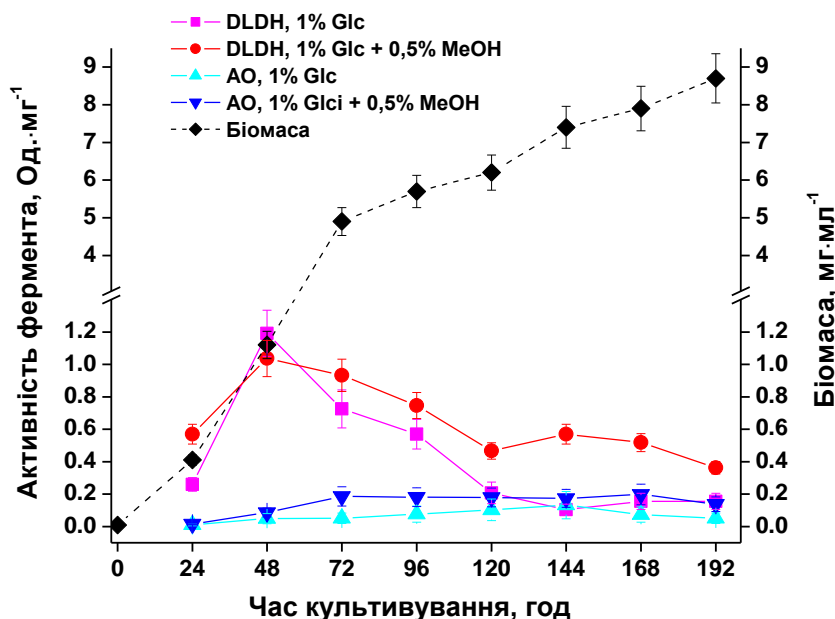


Рис. 3.10. Профіль питомої активності DLDH і алкогольоксидази (АО) пермеабілізованих клітин штаму *O. polymorpha* «tr6». Умови: клітини вирощувались у глюкозному середовищі (Glc) з додаванням і за відсутності 0,5 % метанолу (MeOH).

Для визначення профілю активності DLDH і АО та зменшення потенційного вмісту АО в отриманих припаратах, було використано середовище Беркгольдера - СБ [153] такого складу:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1 г·л<sup>-1</sup>;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 3,5 г·л<sup>-1</sup>;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 1 г·л<sup>-1</sup>. До СБ додавали дріжджовий екстракт "Діфко" 0,5 %. Як джерело Карбону та енергії використовували суміш 1 % глюкози та 0,5 % MeOH або лише 1 % глюкозу. Дріжджі вирощували до середини логарифмічної фази росту в колбах Ерленмейера на круговому шейкері (240 об·хв<sup>-1</sup>) при 30 °С.

Найвища ензиматична активність DLDH пермеабілізованих клітин спостерігалась на 48-50 год росту (Рис. 3.10). При цьому, активність DLDH клітин, вирощених у середовищі з додаванням 0,5 % MeOH, була вищою, хоча незначно, і становила 1,19 Од·мг<sup>-1</sup> порівняно з DLDH активністю клітин, вирощених у контрольному середовищі – 1,0 Од·мг<sup>-1</sup> вологої маси «тіней» клітин. Водночас, активність АО клітин, вирощених без і з додаванням 0,5 % MeOH була найнижчою у цей часовий період - 0,05 та 0,08 Од·мг<sup>-1</sup> вологої маси «тіней» клітин, відповідно. Саме тому 48-50 год є найоптимальніший час культивування для отримання препаратів із високою DLDH- і низькою АО активністю. Водночас, на 48-50 год культивування дріжджів, біомаса клітин становила лише 1,1 мг·мл<sup>-1</sup>, що є недостатньою кількістю для виділення DLDH. Тому для підвищення об'ємного виходу DLDH, клітини вирощували протягом 62 годин, досягаючи значення біомаси клітин 3,3 мг·мл<sup>-1</sup>.

### 3.2.3 Підсумки

У результаті проведеної роботи 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*<sub>2</sub> 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.

Результати досліджень, описані в розділі 3.2, опубліковано в статтях [181, 183-187].

### **3.3. Оптимізація виділення та очистки L- та D-лактат:ферицитохром с-оксидоредуктаз із рекомбінантних штамів дріжджів *O. polymorpha***

Присутність лактат-специфічних оксидоредуктаз у дріжджів при рості за аеробних умов, вперше спостерігали в безклітинних екстрактах отриманих автолізом висушених клітин, проте, активність солубілізованого таким чином фермента, була дуже низькою [188]. Для прикладу, при фізичному руйнуванні клітин пекарських дріжджів на шейкері, із подальшим диференційним центрифугуванням при 144000 g, у екстрактах (супернатанті) спостерігали лишень 13 % ензиматичної активності D-лактат специфічної оксидоредуктази, а 87 % активності фермента проявлялась у преципітаті мітохондріальних фракцій. Виділення фермента, інтегрованого в мембрану мітохондрій, включало низку стадій: обробку преципітатів фосфоліпазою А і бактерійною протеїназою широкої дії; осадження ацетоном; екстракція 20 % Тритоном Х-100 та *n*-бутанолом. За таких умов, із преципітатів мітохондріальних фракцій, вдавалось додатково екстрагувати до 18 % фермента [52].

Оскільки, описані методи виділення лактат-специфічних оксидоредуктаз з дріжджів є низькоефективні, скринінг детергентів для забезпечення максимального виходу ферментів у безклітинні екстракти та розробка ефективних схем їх очистки і стабілізації залишається актуальним завданням.

### 3.3.1. Оптимізація виділення та очистки флавоцитохрому $b_2$ з клітин рекомбінантного штаму *O. polymorpha* «tr1» (*gcr1 catX CYB2*)

#### 3.3.1.1. Скринінг детергентів для виділення ФЦ $b_2$ з клітин дріжджів

Природною локалізацією холофермента ФЦ  $b_2$  є міжмембранний простір мітохондрій, для його ефективної екстракції необхідно використовувати детергенти (див. Табл. 3.3).

Табл. 3.3.

Властивості окремих детергентів [189]

	Концентрація, ммоль·л <sup>-1</sup>	Молекулярна маса, Да	Маса міцели, Да	Агрегаційн е число	Густина, г·мл <sup>-1</sup>
Тритон X-100*	0,24	628	90000	140	0,908
Твін-20*	0,012	1228	76000	60	0,896
NP-40	0,29	617	90000	149	1,103
N-Лауроіл- саркозин	14,57	293,38	-	2	1,033

*Примітка:* \*– ці препарати є полідисперсними сумішами. У таблиці наведено середні значення.

Тритон X-100, Твін-20 та нонілфеноксиполіетоксилетанол (NP-40) є неіонними детергентами. Вони мають незаряджені гідрофільні групи в "головці", що містять поліоксиетиленові компоненти. Взагалі, неіонні детергенти більш придатні для руйнування ліпід-ліпідних або ліпід-білкових взаємодій, ніж білок-білкових, тому вони вважаються неденатуруючими й широко використовуються для виділення мембранних білків у біологічно активній формі. Речовини з поліоксиетиленовими групами в "головці" можуть містити алкілполіетиленові етери із загальною формулою  $C_nH_{2n+1}(OCH_2CH_2)_xOH$  або фенільне кільце між алкільним ланцюгом та етерним угрупованням. Тритон X-100 та NP-40 належать

до останнього класу речовин. Поліоксиетиленовий ланцюг утворює неупорядковане кільце й у подальшому виштовхується з гідрофобного ядра міцели. Алкільні глікозиди все частіше використовуються як неіонні детергенти при виділенні мембранних білків [189]. Для порівняння ефективності використання неіонних детергентів, використано також іонний детергент N-лауроїлсаркозин.

Для вивчення ефективності використання детергентів при виділенні ФЦ  $b_2$  із клітин дріжджів, ліофільно висушені клітини руйнували скляними кульками Ballotini (діаметром 0,5 мм), з використанням відповідних детергентів (Табл. 3.4).

Табл. 3.4.

Характеристика безклітинних екстрактів, отриманих руйнуванням клітин *O. polymorpha* з використанням різних детергентів. Наведено результати типового експерименту

Безклітинний екстракт	V, мл	$C_b$ , мг·мл <sup>-1</sup>	$\Sigma$ б, мг	VA ФЦ $b_2$ , Од·мл <sup>-1</sup>	ПА ФЦ $b_2$ , Од·мг <sup>-1</sup>	$\Sigma$ Од.
Контроль (без додавання детергента)	0,45	14,30	6,40	13,00	0,90	5,85
NP-40 (0,0175 %)	0,45	18,20	8,20	15,00	0,82	6,75
NP-40 (0,035 %)	0,45	18,80	8,50	17,70	0,94	7,97
Твін-20 (1 %)	0,45	15,00	6,75	9,95	0,66	4,48
Тритон X-100 (1 %)	0,40	14,80	5,92	12,00	0,81	4,80
N-лауроїлсаркозин (1 %)	0,40	14,00	5,60	9,95	0,71	3,98

Позначення: V – об’єм;  $C_b$  – концентрація білка;  $\Sigma$  б – сумарна кількість білка; VA – питома об’ємна активність; ПА – питома масова активність;  $\Sigma$  Од. – сумарна кількість одиниць фермента.

Найефективнішим детергентом для екстракції ФЦ  $b_2$  виявився NP-40 у концентрації 0,035 % (Табл. 3.4). Він забезпечував у 1,36 раза вищу об'ємну питому активність ФЦ  $b_2$  у безклітинних екстрактах у порівнянні з контролем. Проте, масова питома активність фермента практично не зростала (0,94 проти 0,90 Од. $\cdot$ мг $^{-1}$ ), що свідчить про те, що цей детергент сприяє кращій екстракції як цільового фермента, так і баластних білків.

Для вивчення можливого інактивууючого впливу окремих детергентів на активність ФЦ  $b_2$  у безклітинних екстрактах (БЕ), було проведено електрофорез БЕ за нативних умов. У лунки 8 % ПААГ вносили однакову кількість ФЦ  $b_2$  (0,03 Од.) і після проведення електрофорезу проводили візуалізацію ферментативної активності відповідно до методики [164].

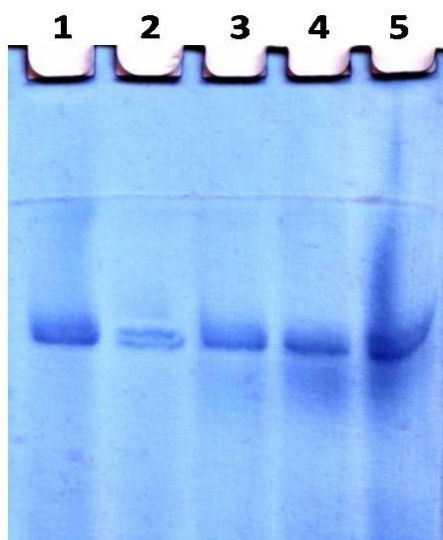


Рис. 3.11. Візуалізація активності ФЦ  $b_2$  безклітинних екстрактів, отриманих за використання різних детергентів: 1) контроль (без додавання детергента); 2) 1 % Твін-20; 3) 1 % N-лауроїлсаркозин; 4) 1 % Тритон X-100; 5) 0,035 % NP-40. Умови нативного електрофорезу: 8 % ПААГ; рН 8,8; 5 год; 60 В; 12 мА; кімнатна температура.

Як видно із Рис. 3.11, практично всі досліджені детергенти не виявляють суттєвої інактивууючої дії на фермент у процесі його виділення. Лише за

використання 1 % Твіну-20 візуально спостерігали зниження активності ФЦ  $b_2$  відносно контролю.

Для забезпечення кращого виходу ФЦ  $b_2$ , після руйнування клітин дріжджів уламки клітин додатково обробляли сумішшю, що містила 10 % бутанол в 50 мМ фосфатному буфері (рН 7,8) з додаванням 1 мМ ЕДТА, 1 мМ ФМСФ та 100 мМ лактату натрію за присутності досліджуваних детергентів (NP-40, Твін-20, Тритон X-100 та N-лауроїлсаркозин). Оптимальні умови обробки уламків клітин були наступні: співвідношення екстрагуючої суміші до уламків клітин - 10 мл на 2 г; час інкубації - 20 годин; температура 4 °С із постійним перемішуванням на магнітній мішалці. Безклітинні екстракти відокремлювали від уламків клітин центрифугуванням за 10000 g. В отриманих екстрактах визначали сумарний білок за Лоурі та питому активність ФЦ  $b_2$  (Табл. 3.5).



Табл. 3.5.

Характеристика безклітинних екстрактів, отриманих із клітин *O. polymorpha* після 20 год. лізису з використанням бутанолу та детергентів. Наведено результати типового експерименту

Супернатант	V, мл	C <sub>б</sub> , мг·мл <sup>-1</sup>	∑ б, мг	VA, Од.·мл <sup>-1</sup>	ПА, Од.·мг <sup>-1</sup>	∑ Од.
Контроль (без додавання детергента)	0,45	16,7	7,50	2,30	0,13	1,04
NP-40 (0,0175 %)	0,45	16,80	7,56	9,00	0,53	4,05
NP-40 (0,035 %)	0,45	17,60	7,90	27,00	1,57	12,15
Твін-20 (1 %)	0,45	15,00	6,00	6,00	0,40	2,70
Тритон X-100 (1 %)	0,45	23,00	10,35	4,60	0,20	2,07
N-лауроїлсаркозин (1 %)	0,45	20,00	9,00	23,00	1,16	10,35

Позначення: V – об'єм; C<sub>б</sub> – концентрація білка; ∑ б – сумарна кількість білка; VA – питома об'ємна активність; ПА – питома масова активність; ∑ Од. – сумарна кількість одиниць фермента

Результати, представлені в табл. 3.5, чітко підтверджують попередні дані про позитивний вплив NP-40 (у концентрації 0,035 %) на екстракцію фермента із уламків клітин протягом їх обробки бутанолом – 12,15 Од. проти 1,04 Од., що майже у 12 разів вище в порівнянні з контролем. Дещо менший вихід фермента спостерігали за використанням N-лауроїлсаркозину – 10,35 Од., що майже в 10 разів перевищує значення контролю. Слід зазначити, що «коефіцієнт якості» екстракції щодо цільового білка в 1,35 раза кращий для системи з NP-40, ніж для системи з N-лауроїлсаркозином (ПА 1,57 Од.·мг<sup>-1</sup> проти 1,16 Од.·мг<sup>-1</sup>, відповідно).

### 3.3.1.2. Опрацювання афінної хроматографії для очистки ФЦ $b_2$ із клітин *O. polymorpha* «tr1»

Природнім акцептором електронів ФЦ  $b_2$  є цитохром  $c$ , що свідчить про специфічне зв'язування цих білків. Для афінної очистки ФЦ  $b_2$  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.

Афінний сорбент синтезували за наступною схемою: до 25 мл силохрому амінопропілового додавали 50 мл 0,25 М ФБ, рН 8,0 та 5 мл 25 %-го глутарового альдегіду. Суміш при помірному перемішуванні на шейкері залишали на ніч при температурі 28 °С. Осад промивали 250 мл 0,05 М ФБ. Модифікацію активованого сорбенту проводили за допомогою цитохрому  $c$ . У колбу вносили 10 мл активованого глутаровим альдегідом амінопропілового силохрому в ФБ, рН 8,0 і додавали розчин цитохром  $c$  у концентрації 2 мг·мл<sup>-1</sup>. Сорбент промивали дистильованою водою при помірному перемішуванні з наступною фільтрацією через фільтрувальний папір. Модифікований силохром сушили на повітрі.

Для контролю ступеня модифікації сорбенту, визначали білок цитохрому  $c$  до і після його зв'язування, промиваючи сорбент 10 мМ ФБ, рН 7,8. Вихідний білок у розчині цитохрому  $c$  з концентрацією 2 мг·мл<sup>-1</sup>, до зв'язування, становив 10 мг, тоді як після зв'язування, в промивках білка залишалось лише 0,5 мг. Отже, 5 мл сорбенту зв'язало близько 9,5 мг цитохрому  $c$ .

Для проведення очистки ФЦ  $b_2$ , 15 мл БЕ з сумарною кількістю одиниць активності ФЦ  $b_2$  278 Од. і кількість 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 активність фермента. За швидкості потоку буферу для елюції в межах 20-25 мл·хв<sup>-1</sup>, було отримано фракцію білків, що не зв'язувалася з сорбентом (ФНБ), і білкові фракції, що елюювалися 0,2 М фосфатним буфером рН 7,8 (Ф1). Результати визначення активності продемонстрували, що активність ФЦ *b*<sub>2</sub> виявлялася у Ф1 і не визначилась у ФНБ, що свідчить про спорідненість фермента до афінного сорбента.

Табл. 3.6.

Етапи очищення ФЦ *b*<sub>2</sub> з використанням афінної хроматографії на іммобілізованому цитохромі *c*. Наведено результати типового експерименту

	V, мл	C <sub>б</sub> , мг·мл <sup>-1</sup>	∑ б, мг	VA, Од.·мл <sup>-1</sup>	ПА, Од.·мг <sup>-1</sup>	∑ Од.	Вихід, %	Очистка, раз
БЕ	15,0	23,9	359,0	18,5	0,77	277,5	=100	-
«Проскок» при нанесенні	10,0	16,0	160,0	слідова	слідова	слідова	-	-
Промивка 25 мМ ФБ, рН 7,8	3,0	22,0	66,0	23,80	1,10	71,0	25,6	1,43
Елюція 50 мМ ФБ, рН 7,8	3,0	6,50	19,5	35,0	5,38	105,0	37,8	8
Елюція 200 мМ ФБ, рН 7.8	3,0	1,0	3,0	10,0	10,0	30,0	10,8	13

Позначення: V – об'єм; C<sub>б</sub> – концентрація білка; ∑ б – сумарна кількість білка; VA – питома об'ємна активність; ПА – питома масова активність; ∑ Од. – сумарна кількість одиниць фермента

Внаслідок проведеної афінної хроматографії, отримано очищений препарат ФЦ  $b_2$  з питомою активністю до  $10 \text{ Од} \cdot \text{мг}^{-1}$ . Вихід фермента за активністю становив 74 %. Для стабілізації фермента, до об'єднаних фракцій елюату додавали сухий амоній сульфат до 70 % від насичення при  $0^\circ\text{C}$ , підтримуючи рН близько 7,5.

Ступінь очистки цільового фермента від баластних білків характеризували, визначаючи його активність та концентрацію білка в кожній фракції елюату (Табл. 3.6), та за допомогою електрофорезу в ПААГ за денатуруючих умов у присутності SDS (Рис. 3.12).

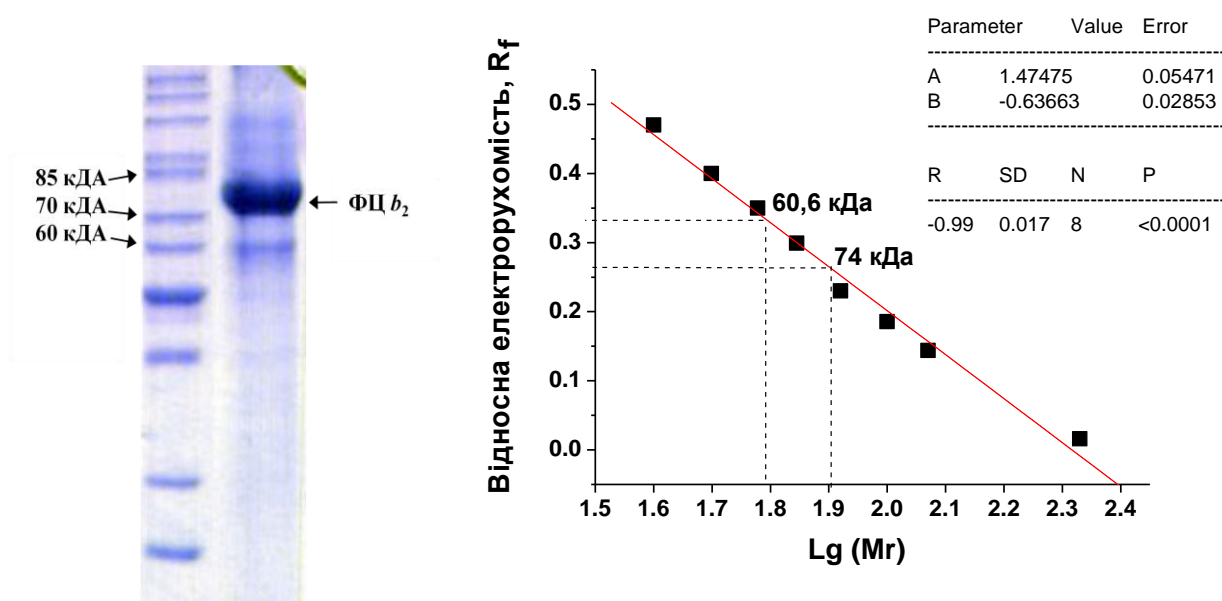


Рис. 3.12. Електрофоретична характеристика та визначення молекулярної маси очищеного препарату ФЦ  $b_2$  *O. polymorpha*, отриманого за допомогою афінної хроматографії. SDS-електрофорез за денатуруючих умов у 12 % ПААГ. Білки забарвлені Кумассі R-250. Наведено дані для типового експерименту.

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 його спектр поглинання у видимій області в порівнянні з цитохромом  $c$ . В обох випадках використовували однакову концентрацію білку –  $1 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ . Спектри реєстрували у кварцовій кюветі із довжиною оптичного шляху  $1 \text{ см}$  в межах довжин хвилі  $350\text{-}700 \text{ нм}$ , на спектрофотометрі SHIMADZU UV-1650 PC, використовуючи стандартну програму “UVProbe 2.20” (Рис. 3.13).

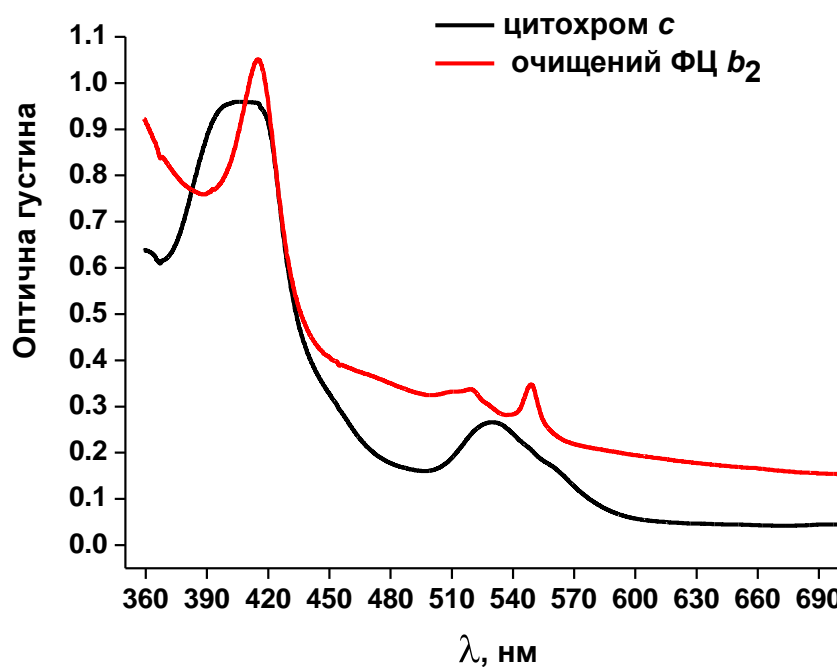


Рис. 3.13. Спектри поглинання цитохрому  $c$  і очищеного препарату фермента (відновлена форма ФЦ  $b_2$ ) у присутності  $0,33 \text{ мМ}$  L-лактату.

У спектрі спостерігали максимуми поглинання гему для цитохрому  $c$  і очищеного ФЦ  $b_2$ , які припадають на  $405$  та  $415 \text{ нм}$ , відповідно. Окрім того, для відновленої форми ФЦ  $b_2$  мають місце максимуми поглинання флавінових груп при  $\lambda=520$  та  $550 \text{ нм}$ ; у випадку цитохрому  $c$  ці піки відсутні. Для препарату цитохрому  $c$  виявлено характерний максимум поглинання за довжини хвилі  $530 \text{ нм}$ .

Для оцінки ефективності афінної хроматографії ФЦ  $b_2$ , її результати порівнювали із параметрами очистки фермента за допомогою іонообмінної хроматографії. Останню проводили на колонці, заповненій комерційним сорбентом DEAE–Тоуорpearl 650M. Після нанесення безклітинних екстрактів на колонку, відбирали „проскок” і промивні розчини, визначаючи в них концентрацію білка та активність ФЦ  $b_2$ . Фракції збирали, слідкуючи за просуванням по колонці буро-забарвленої зони, що відповідає ФЦ  $b_2$ .

Табл. 3.7.

Етапи очищення ФЦ  $b_2$  за допомогою іонообмінної хроматографії на DEAE-целюлозі. Наведено результати типового експерименту

	V, мл	$C_6$ , мг·мл <sup>-1</sup>	$\Sigma$ б, мг	VA, Од.·мл <sup>-1</sup>	ПА, Од.·мг <sup>-1</sup>	$\Sigma$ Од.	Вихід, %	Очистка, раз
БЕ	6,00	23,90	143	18,50	0,77	111	=100	-
«Проскок» при нанесенні	5,00	2,80	14,00	слідова	слідова	слідова		
Елюція 50 мМ ФБ, рН 7,8	3,00	4,75	14,25	слідова	слідова	слідова	-	-
Елюція 125 мМ ФБ, рН 7,8	3,00	1,30	3,90	слідова	слідова	слідова	-	-
Елюція 200 мМ ФБ, рН 7,8	3,00	1,98	5,94	слідова	слідова	слідова	-	-
Елюція 200 мМ ФБ, рН 7.8 + 30 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,20	4,8	10,45	48,3	10,00	106,3	95	13,4

Позначення: V – об’єм;  $C_6$  – концентрація білка;  $\Sigma$  б – сумарна кількість білка; VA – питома об’ємна активність; ПА – питома масова активність;  $\Sigma$  Од. – сумарна кількість одиниць фермента

За допомогою іонообмінної хроматографії отримано препарат ФЦ  $b_2$  з питомою активністю  $10 \text{ Од} \cdot \text{мг}^{-1}$ , що співпадає з характеристикою фермента, очищеного за допомогою афінної хроматографії (у кращій III фракції елюату). Вихід фермента за активністю близький 95 %. Для стабілізації фермента, до об'єднаних фракцій елюату додавали сухий амонію сульфат до 70 % від насичення при  $0^\circ\text{C}$ , підтримуючи рН близько 7,5.

Ступінь очистки ФЦ  $b_2$ , отриманого іонообмінною хроматографією, оцінювали за допомогою електрофорезу в ПААГ за денатуруючих умов у присутності SDS (Рис. 3.14).

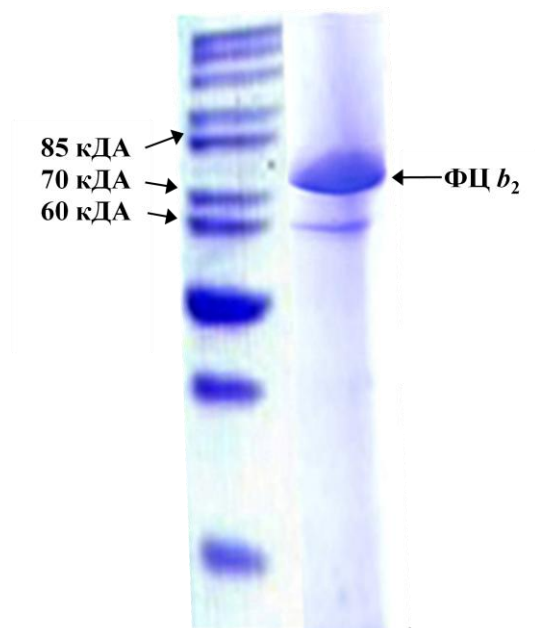


Рис. 3.14. Характеристика препарату ФЦ  $b_2$  *O. polymorpha* «tr1» після очистки іонообмінною хроматографією. SDS-Електрофорез за денатуруючих умов в 12 % ПААГ. Білки забарвлені Кумассі R-250.

Як видно з Рис. 3.14, очищений препарат фермента представлений чіткою домінуючою білковою зоною з молекулярною масою субодиниці 74 кДа. Як і у випадку використання афінної хроматографії, на електрофореграмі препарату

ФЦ  $b_2$  після іонообмінної хроматографії нижче основної зони спостерігається мінорна білкова зона із молекулярною масою 60,6 кДа.

Для додаткової перевірки гомогенності очищених препаратів ФЦ  $b_2$ , проведено дослідження спектральних характеристик окисленої та відновленої форм фермента. Відновлення вихідної окисленої форми очищеного ФЦ  $b_2$  проводили додаванням 0,3 мМ L-лактату (субстрату) до вихідного препарата фермента.

Спектри препарата ФЦ  $b_2$  з питомою активністю 10 Од·мг<sup>-1</sup> та концентрацією білка 4,8 мг·мл<sup>-1</sup> реєстрували на спектрофотометрі SHIMADZU UV-1650 PC (Рис. 3.15).



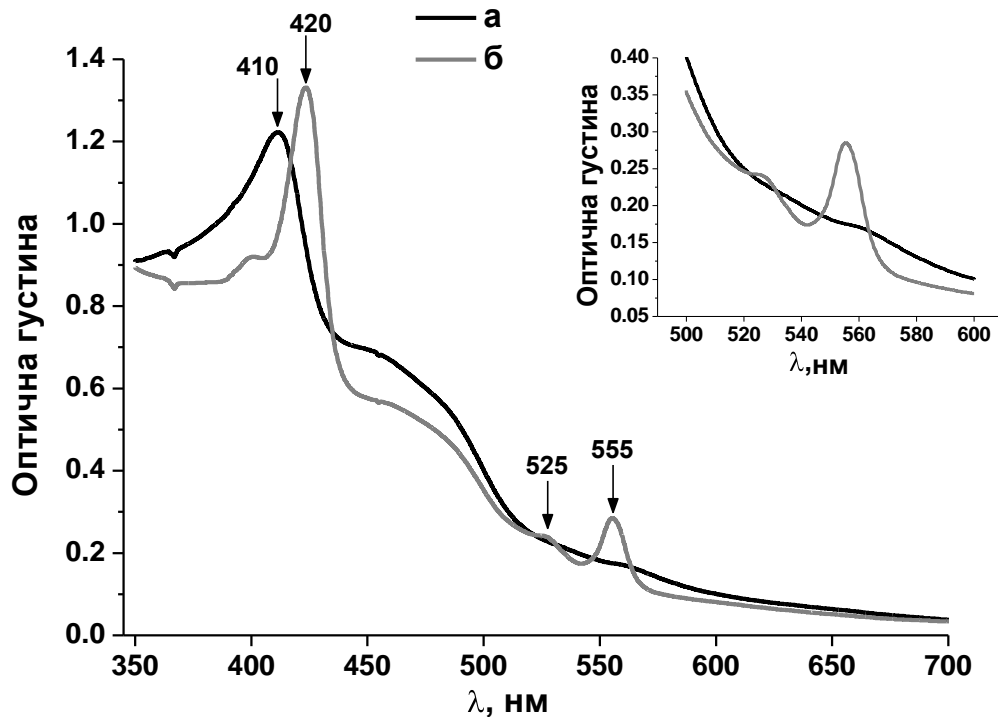


Рис. 3.15. Спектри поглинання ФЦ  $b_2$  вихідної окисленої (а) та відновленої форми (у присутності 0,3 мМ L- лактату) (б).

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  $b_2$  [41]. Окрім того, чіткий пік Соре свідчить про високу чистоту очищеного препарату ФЦ  $b_2$ .

### 3.3.1.3. Пошук стабілізуючих компонентів та оптимізація умов зберігання очищених препаратів ФЦ $b_2$ із клітин *O. polymorpha* «tr1»

У процесі тестування потенційних стабілізуючих компонентів для зберігання фермента, препарат очищеного ФЦ  $b_2$  із активністю 20 Од·мл<sup>-1</sup>, що містив 25 мМ Тріс-ФБ, рН 8,5, 1 мМ ЕДТА та 1 мМ ФМСФ (інгібітор протеаз), інкубували у присутності низки органічних та неорганічних речовин: 40 % гліцеролу, 40 % сахарози та 70 % сульфату амонію. Як контроль, при аналізі стабілізуючого впливу різних речовин використовували препарат ФЦ  $b_2$  без додавання жодних стабілізаторів (Рис. 3.16).

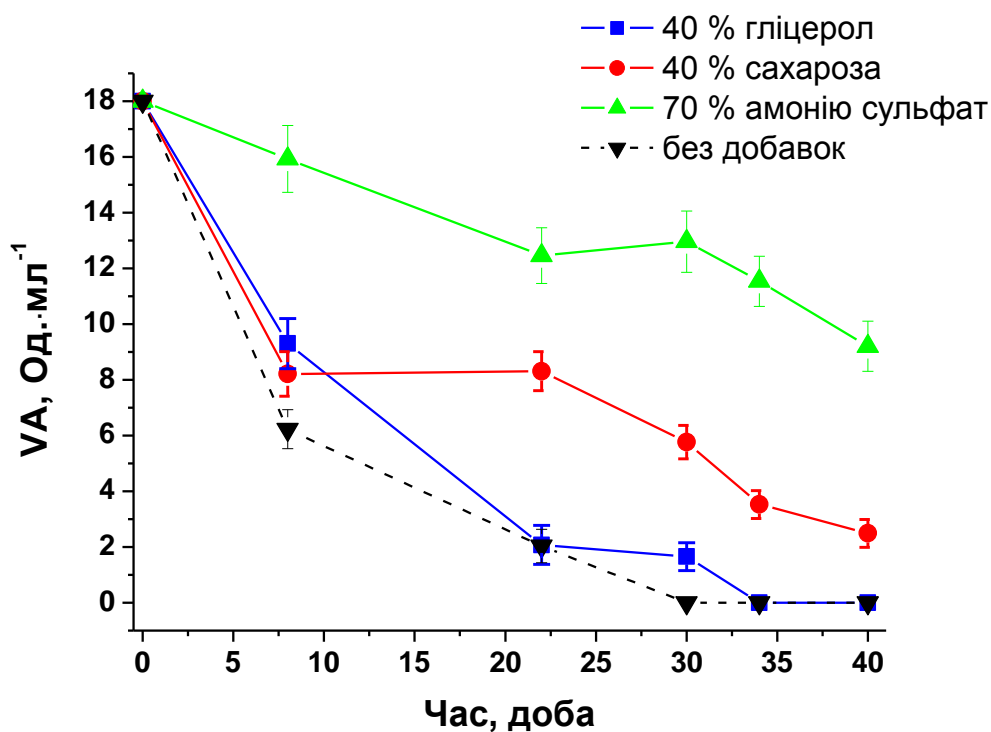


Рис. 3.16. Питома об'ємна активність препаратів очищеного ФЦ  $b_2$  ( $VA = 20$  Од·мл<sup>-1</sup>) за використання низки стабілізуючих агентів: 40 % гліцеролу; 40 % сахарози; 70 % амонію сульфату. Умови зберігання: 25 мМ Тріс-ФБ, рН 8,5; 1 мМ ЕДТА; 1 мМ ФМСФ та один із стабілізуючих агентів при 4 °С у щільно закритих світлонепроникних пробірках.

Найкращий стабілізуючий ефект спостерігали за використання 70 % амонію сульфату (Рис. 3.16). Проте, навіть за його використання, активність очищеного препарату на п'ятнадцяту добу зберігання знижувалась у 1,43 раза (до 14 Од. $\cdot$ мл $^{-1}$ ), що свідчить про необхідність проведення подальших досліджень із пошуку оптимальних стабілізаторів фермента.

Залежність активності очищеного препарату ФЦ  $b_2$  від температур зберігання наведено на рисунку 3.17.

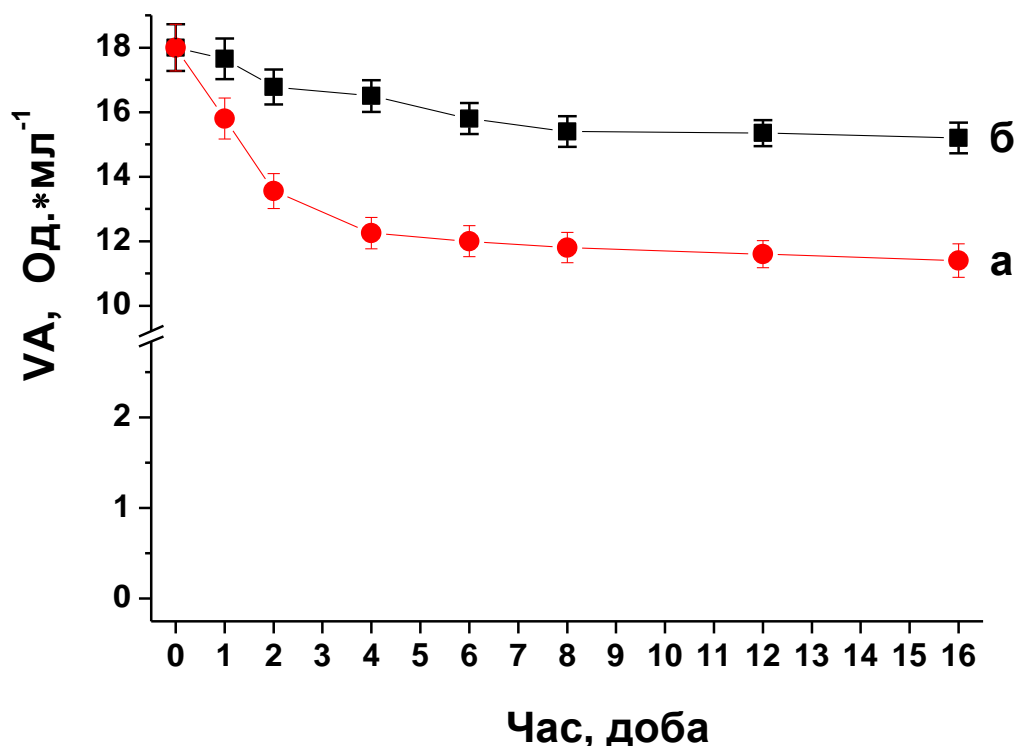


Рис. 3.17. Залежність питомої об'ємної активності очищеного препарату ФЦ  $b_2$  (вихідна  $VA = 20$  Од. $\cdot$ мл $^{-1}$ ) при різних температурних режимах зберігання. Умови зберігання: 25 мМ Тріс-ФБ, рН 8,5; 1 мМ ЕДТА; 1 мМ ФМСФ у 70 % амонію сульфаті у щільно закритих світлонепроникних пробірках при 4 °C (а) та -20 °C (б).

Отримані результати свідчать, що за використання як стабілізуючого агенту 70 % амонію сульфату, оптимальною температурою для зберігання є  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Так, на шістнадцяту добу зберігання препарата ФЦ  $b_2$  із VA 20 Од·мл<sup>-1</sup> за температури  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , активність фермента становила 15,2 Од·мл<sup>-1</sup>, що відповідає 76 % від його вихідної активності. У разі зберігання препарата за температури  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  протягом шістнадцяти діб, активність ФЦ  $b_2$  становила 11,4 Од·мл<sup>-1</sup>, що відповідає 57 % від вихідної активності препарата (Рис. 3.17).

Отже, в результаті роботи опрацьовано схему виділення ФЦ  $b_2$  з клітин рекомбінантного штаму *O. polymorpha* «tr1» із використанням різних детергентів. Розроблено новий метод очистки ФЦ  $b_2$  із клітин метилотрофних дріжджів *O. polymorpha* на основі афінної хроматографії на іммобілізованому цитохромі *c*. Охарактеризовано фізико-хімічні властивості отриманих препаратів ферментів. Оптимізовано умови стабілізації очищеного препарату ФЦ  $b_2$ .

### **3.3.2. Розробка схеми виділення DLDH із клітин *O. polymorpha* «tr6» (*gcr1 catX cyb2Δ/DLD1*) та очистки ферменту**

За основу схеми виділення DLDH *O. polymorpha* послужив метод, описаний для дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* [52, 134].

Клітини дріжджів трансформанта «tr6» *O. polymorpha* вирощували в середовищі «Беркгольдера» у колбах при  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  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 в кульовому млині скляними кульками Балотіні. Руйнування відбувалося в ФБ, рН 7,8 із 1 мМ ФМСФ без додання ЕДТА, оскільки раніше нами було виявлено негативний вплив хелатора ЕДТА на активність DLDH.

Руйнування клітин проводили за схемою: 1,5 хвилинне руйнування на Вортексі з 6 хв. охолодженням на льоді (повтор процедури - 5 разів). Після цього відбирали БЕ, а до уламків клітин вносили 50 мМ ФБ, рН 7,8 та повторювали руйнування за попередньою схемою. Отриманий БЕ характеризувався активністю DLDH 1,2 Од·мл<sup>-1</sup>. Однак, більш оптимальною виявилась схема, яка включала: 2-о хвилинне руйнування на Вортексі та 8 хв. охолодження на льоді (повтор - двічі). Активність DLDH у БЕ, за такої схеми фізичного руйнування, становила 2,0 Од·мл<sup>-1</sup>.

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 охолодженим 50 % ацетоном та осаджували центрифугуванням (30 хв; 2 000 об·хв<sup>-1</sup>; -5 °С). Отриманий осад розчиняли в 5 мл 50 мМ ФБ, рН 7,5 та наносили на колонку, заповнену сорбентом DEAE-Toyopearl 650M (TSK-GEL, Японія).

„Проскок” і промивні розчини відбирали та визначали в них концентрацію білка та активність DLDH. При елюції фермента спостерігалось його вимивання із верхнього шару сорбенту у вигляді більш забарвленої зони. Збирали фракції об'ємом 3 мл. Ступінь очистки цільового фермента від баластних білків характеризували, визначаючи його активність і концентрацію білка в кожній фракції елюату (Табл. 3.8), та за допомогою електрофорезу в ПААГ за денатуруючих умов у присутності SDS (Рис. 3.18).

Табл. 3.8.

Концентрація білка та активність DLDH *O. polymorpha* «tr6» різних фракцій при іонообмінній хроматографії. Наведено результати типового експерименту

	V, мл	C <sub>б</sub> , мг·мл <sup>-1</sup>	∑ б, мг	VA, Од·мл <sup>-1</sup>	ПА, Од·мг <sup>-1</sup>	∑ Од.	Вихід, %	Ступень очистки, раз
Розчин осаду після фракціонування ацетоном	1,3	17,5	23,0	2,6	0,15	3,4	100	-
«Промиви»	3,0	6,1	18,3	1,1	0,18	3,3	97	1,2
E1 (15% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> в 0,2 М ФБ рН 7,8 )	2,0	1,1	2,2	0,58	0,8	1,2	35	5,3
E2 (70 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> в 0,2 М ФБ рН 7.8 + 0,75 NaCl + 1 % Тритон X-100)	6,0	0,97	5,82	0,6	1,1	3,6	19	7,0

Позначення: V – об'єм; C<sub>б</sub> – концентрація білка; ∑ б – сумарна кількість білка;  
VA – питома об'ємна активність; ПА – питома масова активність;  
∑ Од. – сумарна кількість одиниць ферменту

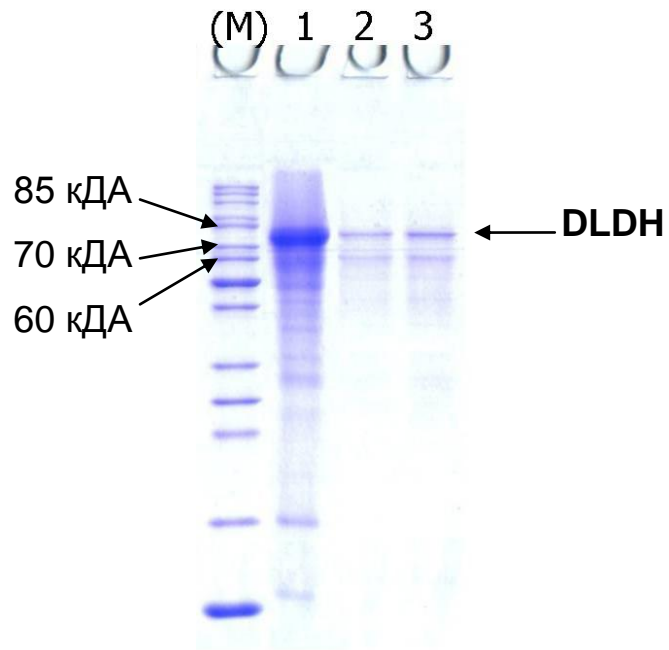


Рис. 3.18. Електрофоретична характеристика сконцентрованого безклітинного екстракту до нанесення на колонку (1) та очищеного препарату DLDH *O. polymorpha* «tr6» (2, 3). SDS-електрофорез за денатуруючих умов (12 % SDS-ПААГ), білки забарвлені Кумасі R-250. (M) - маркери молекулярної маси.

Вихід за активністю ферменту після стадії хроматографічної очистки становив приблизно 50 %. Найвища питома активність в окремих фракціях зі ступенем очистки 7 разів досягала  $1,1 \text{ Од} \cdot \text{мг}^{-1}$ . Для стабілізації фермента, до об'єднаних фракцій елюату додавали сухий сульфат амонію до 70 % (насичення) при  $0^\circ\text{C}$ , підтримуючи рН близько 7,5.

Досліджено рН оптимум очищеного препарату DLDH *O. polymorpha* «tr6» (Рис. 3.19).

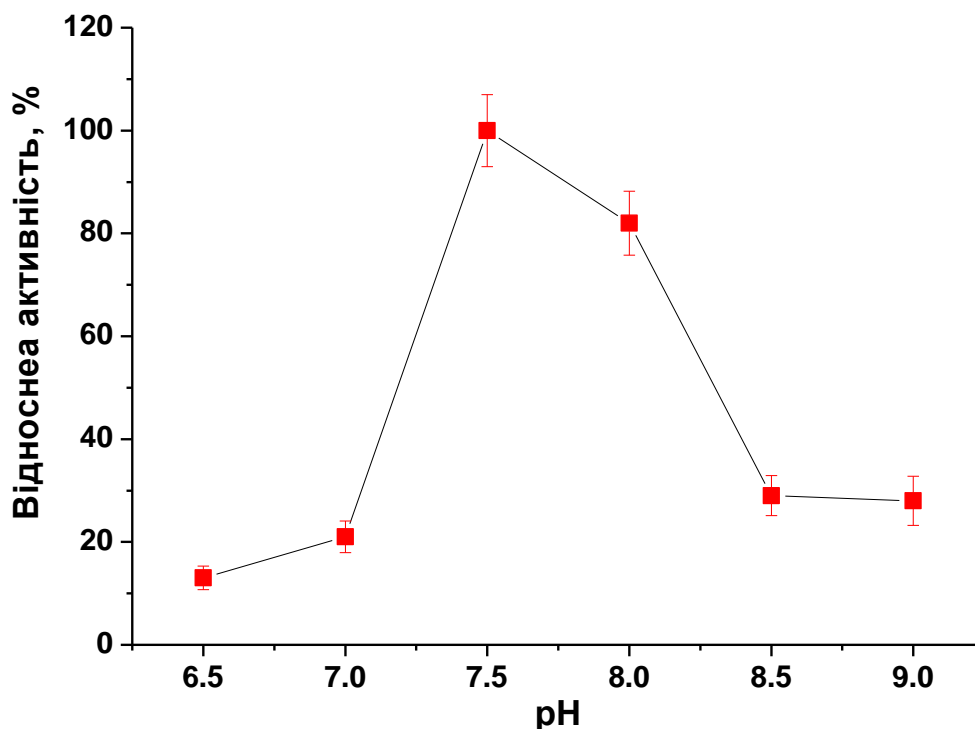


Рис. 3.19. Відносна активність очищеного препарату DLDH при різних значеннях рН (30 мМ ФБ та Тріс-ФБ).

З'ясовано, що рН-оптимум ферменту виділеного із *Archaeoglobus fulgidus* знаходиться в межах від 7,5 до 8,0 (Рис. 3.19), що узгоджується із даними літератури [182].

### 3.3.3. Підсумки

Дріжджові L- та D-лактат:ферицитохром *c*-оксидоредуктази (флавоцитохром  $b_2$  та DLDH) є мітохондріальними мембранозв'язаними білками, що суттєво ускладнює процес їх виділення та очистки. На світовому ринку досі відсутні комерційні препарати обох ферментів, а описані в літературі очищені препарати, характеризуються низькою питомою активністю та недостатньою стабільністю при зберіганні [43, 134]. У зв'язку з цим, нами проведено скринінг



низки детергентів для забезпечення максимального виходу ферментів у безклітинні екстракти, розробити ефективні схеми їх очистки та стабілізації.

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. Розроблено схему очищення DLDH із клітин штаму дріжджів *O. polymorpha* «tr6». Для обох ферментних препаратів проведено фізико-хімічну і ензимологічну їх характеристику.

Результати досліджень, описані в розділі 3.3, опубліковано в статтях [181, 182, 184, 190, 191].

#### **3.4. Створення лабораторних прототипів біореакторів для конверсії рацемату молочної кислоти до оптично чистого L-ізомера та усунення D-лактату з молочнокислих продуктів**

Суміш рівних кількостей енантіомерів є оптично неактивна, її називають рацемічною сумішшю (рацематом). Рацемати відрізняються від індивідуальних енантіомерів фізичними властивостями, вони можуть мати різну температуру плавлення, розчинність та відрізняються спектральними характеристиками. Особливо важливим є відмінність впливу стереоізомерів на живі організми.

Отримання чистих стереоізомерних форм – важливе завдання багатьох біотехнологічних досліджень. Для отримання чистих стереоізомерів ці суміші необхідно розділяти [192]. Для розділення рацематів на енантіомери користуються трьома методами: 1) механічним - у результаті кристалізації деяких оптично активних сполук можуть утворюватися дві форми кристалів, схожих один на одного як предмет і його дзеркальне відображення. Їх можна відокремити під мікроскопом препаративної голкою (механічно); 2) біохімічний метод - заснований на тому, що певні види мікроорганізмів надають перевагу

споживанню одної із енантіомерних форм, а друга залишається незасвоєною і може бути легко відділена; 3) хімічний метод - в його основі лежить трансформація енантіомерів за допомогою оптично активних реагентів в діастереомери, які вже відрізняються один від одного за фізичними властивостями. Діастереомери набагато легше розділити [193]. Нами запропоновано новий ензиматичний підхід отримання чистого стереоізомеру L- чи D-лактату із рацемату молочної кислоти шляхом ензиматичної конверсії одного із стереоізомерів специфічними L- чи D-лактат:ферицитохром *c*-оксидоредуктазами.

#### **3.4.1. Отримання D-лактату з рацемату шляхом специфічного окислення L-лактату**

L-лактат утворюється шляхом мікробіологічного синтезу і широко використовується як харчова добавка у фармацевтичній та хімічній промисловості. У той же час, D-лактат необхідний як сировина для синтезу деяких агрохімікатів, інгібіторів конвертази ангіотензину, а також для інших цілей, однак є дуже дорогою речовиною порівняно з L-лактатом і L,D-рацематом, які отримують за допомогою хімічного синтезу [194]. Отже, існує потреба в опрацюванні біотехнологічних підходів, у тому числі і ензиматичних, для отримання оптично чистого D-ізомеру з дешевого рацемату.

З метою енантіомеризації рацемату молочної кислоти, з точки зору отримання D-лактату, 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 та 0,5 Од·мл<sup>-1</sup> у суміші з 10 мМ L,D-рацематом молочної кислоти при рН 7,0 і температурі 37 °С (Рис. 3.20).

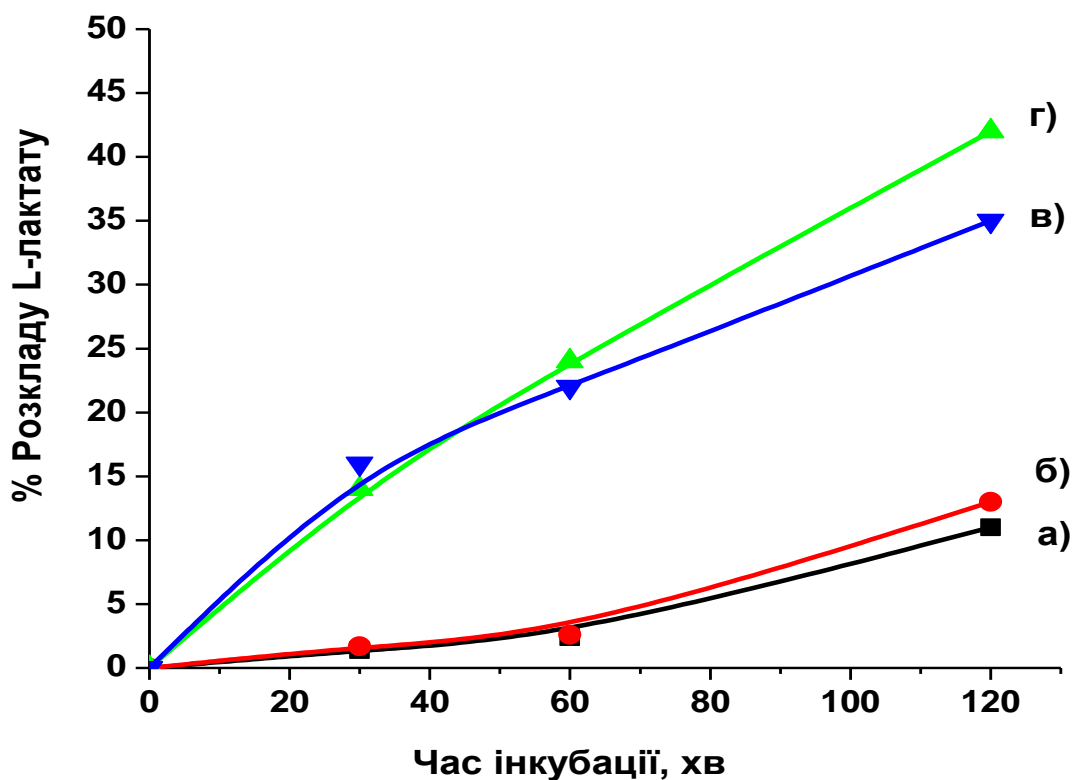


Рис. 3.20. Кінетика розщеплення L-лактату в модельній суміші 10 мМ та 50 мМ рацемату лактату за допомогою ФЦ  $b_2$ . Умови реакції: температура 37°C, 10 мМ MOPS буфер, рН 7,0, 10 мМ феназинметасульфат (ФМС). Позначення: (а) 50 мМ D,L-лактат, 0,5 Од·мл<sup>-1</sup> ФЦ  $b_2$ ; (б) 50 мМ D,L-лактат, 1,0 Од·мл<sup>-1</sup> ФЦ  $b_2$ ; (в) 10 мМ D,L-лактат, 0,5 Од·мл<sup>-1</sup> ФЦ  $b_2$ ; (г) 10 мМ D,L-лактат, 1,0 Од·мл<sup>-1</sup> ФЦ  $b_2$ . Наведено результати типового експерименту.

Продуктивність розщеплення 10 мМ лактату в процесі 2-годинної інкубації складала 37 % - 43 %, з середньою продуктивністю приблизно 0,2 ммоль·л<sup>-1</sup>·год<sup>-1</sup>. За подібних умов, але при використанні 50 мМ рацемату, продуктивність розщеплення становила 10 % - 15 % (Рис. 3.20).

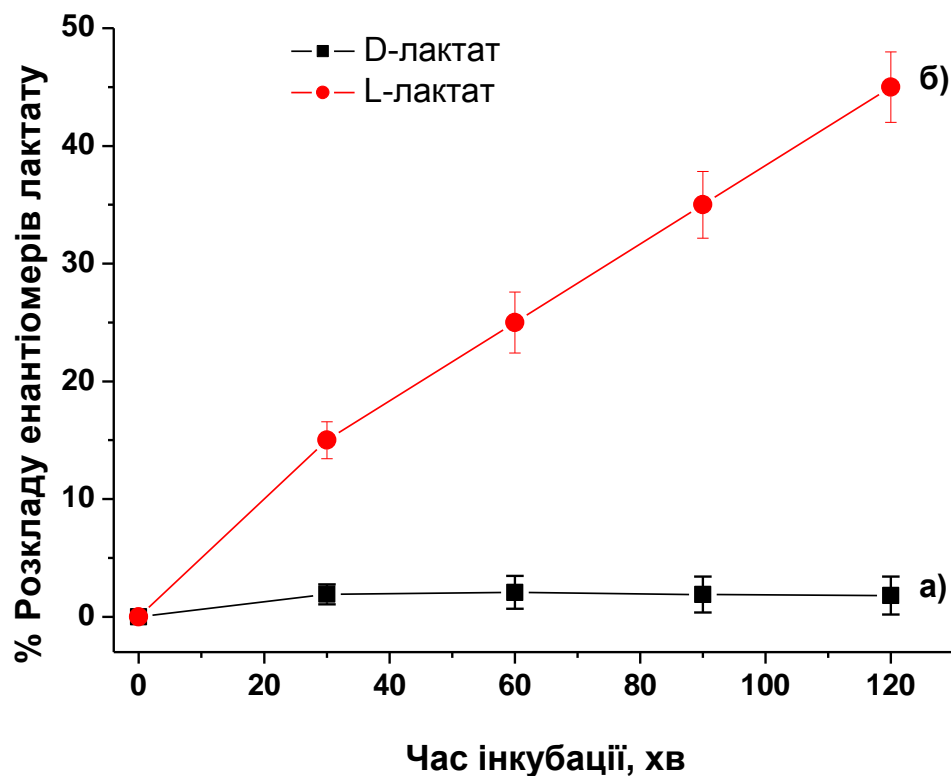


Рис. 3.21. Кінетика розщеплення лактату в модельній суміші 10 мМ рацемату лактату за допомогою очищеного препарату ФЦ  $b_2$ : (а) – D-лактат; (б) – L-лактат. Умови: 10 мМ МОПС-буфер, рН 7,0, 10 мМ ФМС, вихідна концентрація D,L-лактату - 10 мМ, 1,0 Од·мл<sup>-1</sup> ферменту при температурі 37 °С.

Оскільки ФЦ  $b_2$  володіє абсолютною специфічністю до L-лактату і не окислює D-лактат, розклад D-енантіомеру в даній модельній суміші не відбувався, тоді як за 120 хв розкладається 43 % L-енантіомеру лактату (Рис. 3.21).

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

### 3.4.2. Дослідження мікробіологічного розкладу D-лактату з рацемату молочної кислоти

Для дослідження можливості мікробіологічного розкладу D-лактату із рацемату нами запропоновано ідею застосування рекомбінантного штаму *O. polymorpha* «tr6», який не володіє L-лактат-оксидоредуктазною активністю внаслідок делеції гена *CYB2*, що кодує флавоцитохром  $b_2$ , але здатний до надекспресії продукту гена *DLD1* – оксидоредуктази D-лактату. Цей штам міг би використовуватись для усунення D-лактату з ферментованих продуктів харчування. Для цього запропоновано два типи клітин штаму *O. polymorpha* «tr6» - живі (інтактні) та пермеабілізовані ліофілізовані клітини. Питома ензиматична активність інтактних клітин була  $1,26 \text{ Од} \cdot \text{мг}^{-1}$ , а пермеабілізованих ліофілізованих клітин –  $1,17 \text{ Од} \cdot \text{мг}^{-1}$ , відповідно.

Експеримент здійснювали наступним чином: до 50 мл 10 мМ фосфатного буферу рН 7,8 було додано 20 мМ D-лактат та 0,1 г інтактних клітини. Паралельно, проводили інкубацію 0,05 г пермеабілізованих ліофілізованих клітин *O. polymorpha* «tr6» в аналогічній суміші. Отриману модельну суміш інкубували протягом години на шейкері ( $200 \text{ об} \cdot \text{хв}^{-1}$ ) при  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Кожні 10 хв аліквоти суміші відбирали і заморожували при  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Після закінчення експерименту, залишковий D-лактат в заморожених зразках аналізували хімічним методом Бюхнера [195].

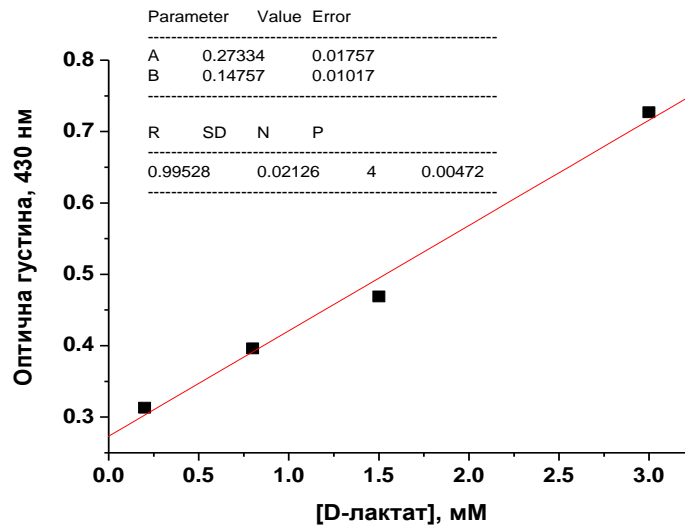
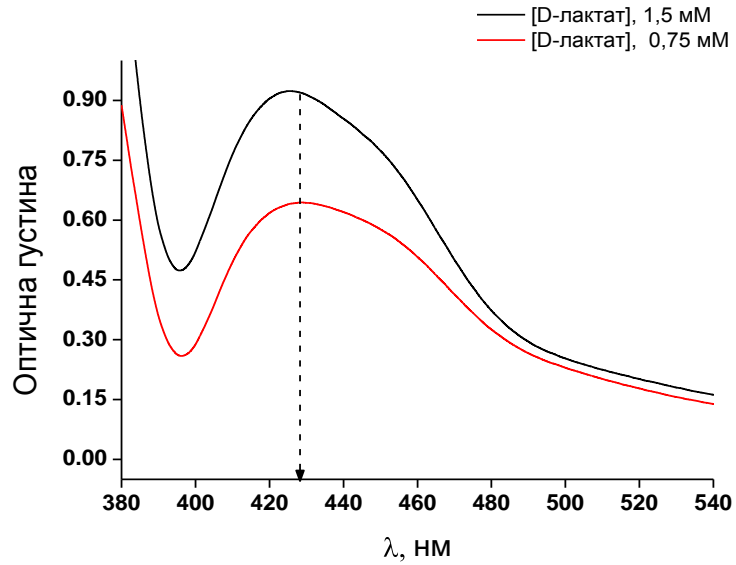


Рис. 3.22. Визначення максимуму поглинання реакційної суміші (зверху) та калібрувальна крива (знизу) хімічного методу визначення лактату за Бюхнером. Наведено результати типового експерименту.

Результати визначення залишкового D-лактату методом Бюхнера у пробах, відібраних на різних стадіях інкубації з двома типами клітин штаму *O. polymorpha* «tr6» в модельній суміші, що містила 20 мМ D-лактат, наведено в Табл. 3.9.

Результати типового експерименту визначення залишкового D-лактату методом Бюхнера у пробах, отриманих за використання 2-х типів дріжджових клітин

Час інкубації, хв	D-лактат, мМ (пермеабілізовані клітини)	D-лактат, мМ (інтактні клітини)
0	20,0	20,0
10	-	19,87
20	18,0	-
30	15,5	15,51
40	11,9	14,48
50	12,5	-
60	11,98	14,5

Динаміку процесу розщеплення D-лактату показано на Рис. 3.23.

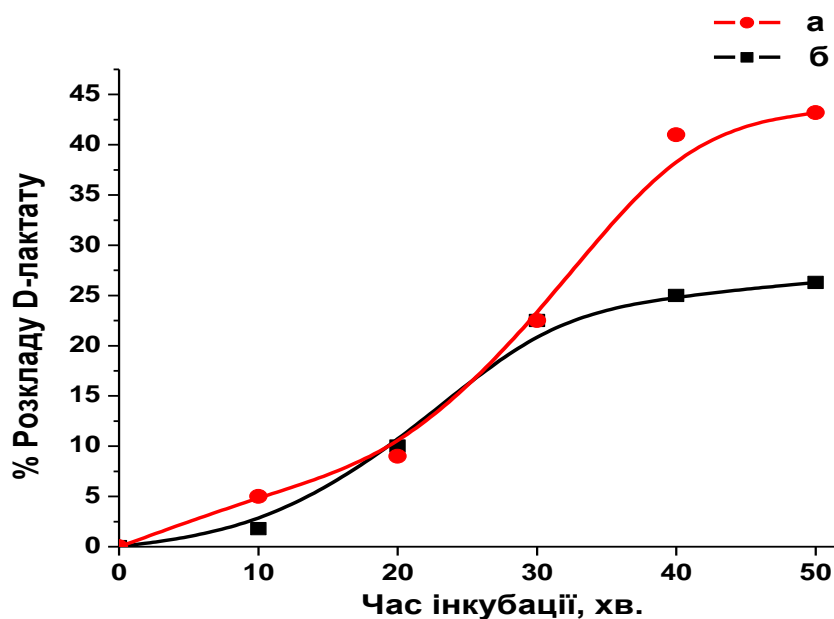


Рис. 3.23. Кінетика розщеплення D-лактату за допомогою рекомбінантних клітин *O. polymorpha* «tr6»: (а) – пермеабілізовані, ліофілізовані клітини; (б) – живі клітини. Умови реакції: 10 мМ фосфатний буфер, рН 7,8, 30 °С, аерація

на шейкері (200 об·хв<sup>-1</sup>) при 30 °С; вихідна концентрація D-лактату - 20 мМ. Наведено результати типового експерименту.

Ефективність окислення D-лактату (упродовж відносно короткого часу інкубації – 40 хв) при використанні живих клітин дріжджів (активність DLDH 1,26 Од·мг<sup>-1</sup>) складала 28 %; тоді як для пермеабілізованих ліофілізованих клітин (з активністю DLDH 1,12 Од·мг<sup>-1</sup>) – 41 %. Середня продуктивність процесу (для інкубації протягом 30 хв) складає приблизно 9,0 ммоль·л<sup>-1</sup>·год<sup>-1</sup>.

Підсумовуючи, можна сказати, що обидва типи рекомбінантних клітин *O. polymorpha* «tr6» здатні до ефективного розкладу D-лактату протягом 30 хв інкубації. Однак, пермеабілізовані ліофілізовані клітини штаму *O. polymorpha* «tr6» є більш ефективними агентами для усунення D-лактату, очевидно, внаслідок кращої проникності клітинних мембран, зумовленої пермеабілізацією. Ліофілізовані клітини є більш перспективними теж з огляду їх вищої стабільності при зберіганні, порівняно з інтактними клітинами.

### 3.4.3. Створення прототипу біореактора для детоксикації D-лактату

Попередні експерименти із розкладу D-лактату показали, що пермеабілізовані клітини штаму *O. polymorpha* «tr6» є більш ефективні порівняно з інтактними клітинами. Тому для створення біореактора на основі клітин, здатних до детоксикації D-лактату, нами використано пермеабілізовані ліофілізовані клітини штаму *O. polymorpha* «tr6». Питома ензиматична активність цих клітин становила 1,33 Од·мг<sup>-1</sup>.

Імобілізацію дріжджових клітин в кальцій-альгінатному гелі здійснювали наступним чином: до суспензії пермеабілізованих клітин *O. polymorpha* «tr6» (30 мг·мл<sup>-1</sup>) додавали 2 мл 4 % альгінату натрію. Отриману суспензію покрпельно додавали до розчину CaCl<sub>2</sub> (40 або 70 мг·мл<sup>-1</sup>). Тип утворених



альгінатних кульок тісно корелював з концентрацією  $\text{CaCl}_2$ . У випадку використання концентрації  $70 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ , формувались кульки діаметром близько 3 мм, а при використанні концентрації  $\text{CaCl}_2$   $40 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$  - отримували овальні частинки діаметром близько 1,5 мм і поперечником 0,6 - 0,7 мм. Альгінатні кульки з іммобілізованими пермеабілізованими клітинами поміщали у колонку  $1 \times 10 \text{ см}$  (4 мл гелю). Для контролю, було використано кульки альгінатного гелю без клітин (Рис. 3.24).

#### Модельний розчин D-лактату

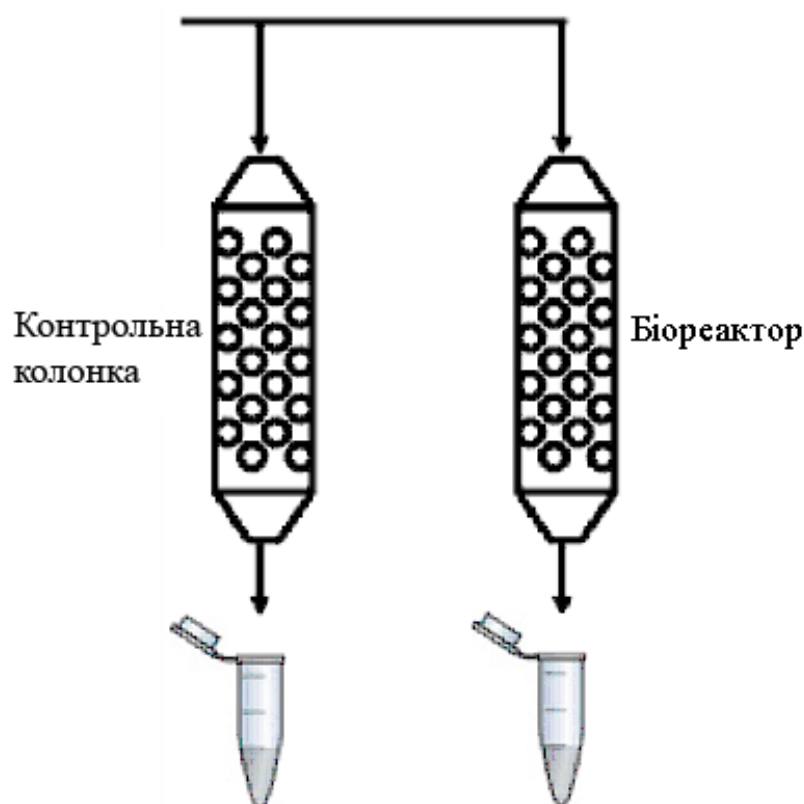


Рис. 3.24. Схема біореактора на основі пермеабілізованих дріжджових клітин для усунення D-лактату з водного розчину. Контрольна колонка містить гель без клітин.

Запаковану колонку промивали 3 мл фосфатного буферу рН 7,8. Як модельну суміш, використовували 20 мМ D-лактат в 50 мМ ФБ, рН 7,8 і

1 mM CaCl<sub>2</sub>. Ця суміш протікала через колонки з різною швидкістю - 50 мл·хв<sup>-1</sup> для першого типу біореактора і 10 мл·хв<sup>-1</sup> для біореактора другого типу. Невеликі аліквоти розчину після пропускання через колонки відбирали кожні 15 хв і заморожували при -20 °С. Після завершення експерименту, залишковий D-лактат визначали хімічним методом Бюхнера (Рис. 3.25).

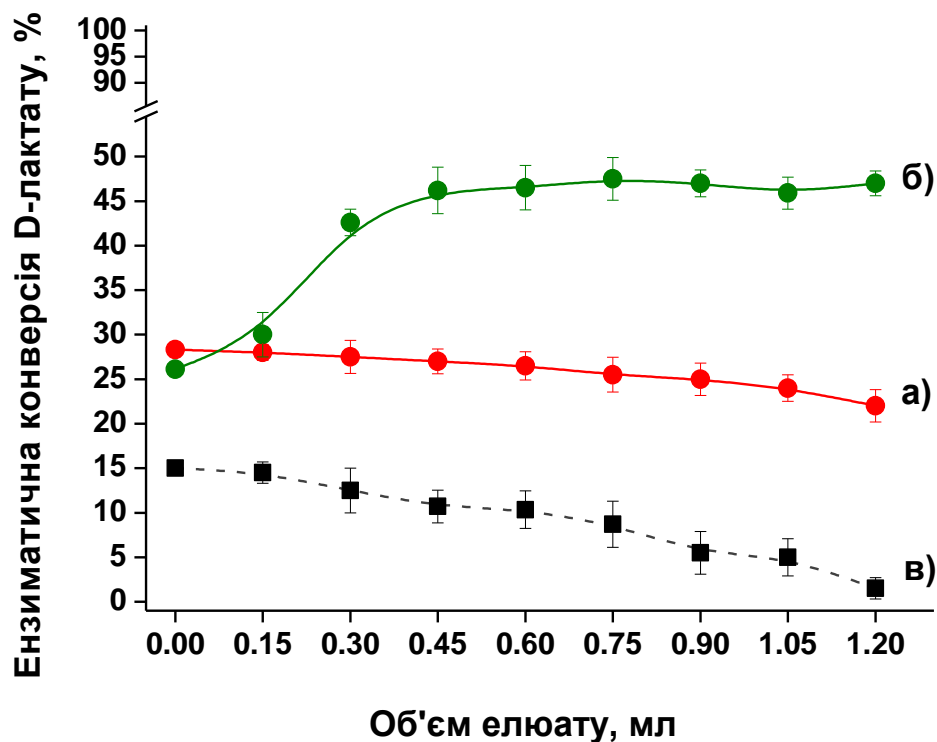


Рис. 3.25. Залежність ензиматичної конверсії від швидкості потоку для ензиматичної конверсії D-лактату біореакторами на основі пермеабілізованих клітини *O. polymorpha* «tr6». (а) «біореактор 1» зі швидкістю потоку 50 мкл·хв<sup>-1</sup>; (б) «біореактор 2» - швидкість потоку 10 мкл·хв<sup>-1</sup>; (в) «контрольний реактор» - швидкість потоку 10 мкл·хв<sup>-1</sup>. Умови: ензиматична активність DLDH пермеабілізованих клітин - 80 Од·мл<sup>-1</sup>, концентрація клітин - 60 мг·мл<sup>-1</sup>, вихідна концентрація D-лактату - 20 мМ в 50 мМ ФБ, рН 7,8, у присутності 1 мМ CaCl<sub>2</sub>.

Як показано на Рис. 3.25, ефективність розкладу D-лактату біореакторами є суттєво різною, що залежить від швидкості потоку через колонку. Так, у випадку «біореактора 1» (зі швидкістю потоку  $50 \text{ мкл}\cdot\text{хв}^{-1}$ ) ензиматична конверсія після пропускання 2 мл 20 мМ D-лактату коливалась в межах 15 - 28 %. У цей же час, «біореактор 2» (зі швидкістю потоку  $10 \text{ мкл}\cdot\text{хв}^{-1}$ ) демонстрував удвічі вищу ефективність – на рівні 45 – 53 %. Для того, щоб встановити причини досить низької ефективності конверсії D-лактату «біореактором 1» було досліджено операційну стабільність біореакторів різних типів (Рис. 3.26).

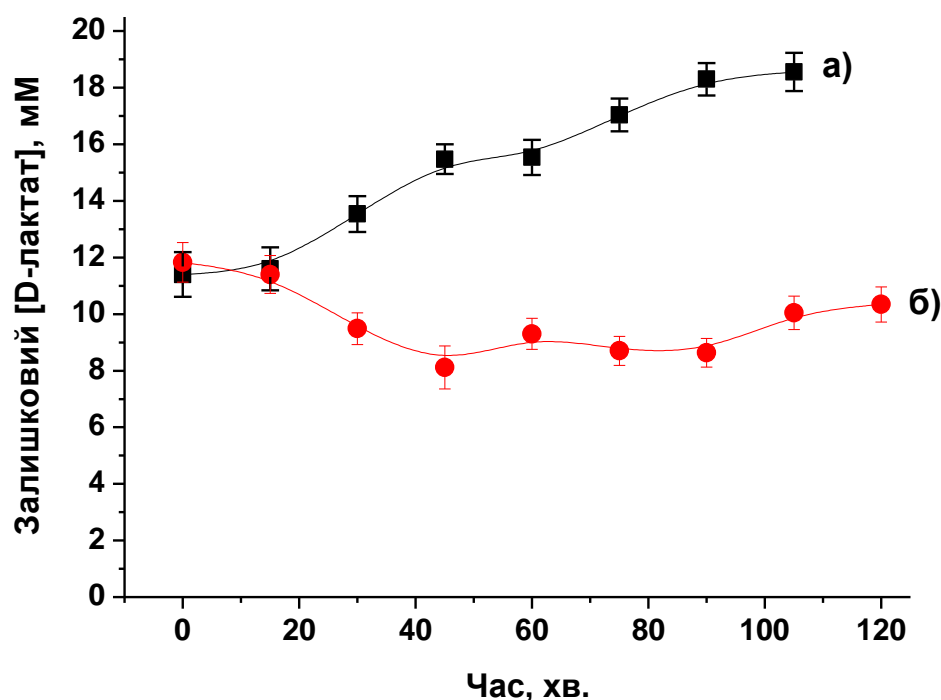


Рис. 3.26. Операційна стабільність двох типів біореакторів на основі пермеабілізованих клітини *O. polymorpha* «tr6». (а) «біореактор 1» зі швидкістю потоку  $50 \text{ мкл}\cdot\text{хв}^{-1}$ ; (б) «біореактор 2» - швидкість потоку  $10 \text{ мкл}\cdot\text{хв}^{-1}$ . Умови: ензиматична активність DLDH в пермеабілізованих клітинах -  $80 \text{ Од}\cdot\text{мл}^{-1}$ , концентрація клітин -  $60 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ , вихідна концентрація D-лактату - 20 мМ в 50 мМ ФБ, рН 7,8 у присутності 1 мМ  $\text{CaCl}_2$ .

Як видно із результатів, представлених на Рис. 3.26, за швидкості потоку  $50 \text{ мл}\cdot\text{хв}^{-1}$ , спостерігалось зниження ефективності розкладу D-лактату «біореактором 1», можливо, внаслідок поступового вимивання клітин. У результаті зменшення активності DLDH, концентрація D-лактату у відібраних зразках з часом відновлювалась до рівня вихідного модельного розчину. Біореактор другого типу, продемонстрував більш стабільну здатність до розкладу D-лактату, внаслідок кращого утримання клітин у колонці при зменшенні швидкості потоку до  $10 \text{ мл}\cdot\text{хв}^{-1}$ .

Таким чином, доведено можливість використання пермеабілізованих клітин рекомбінантного надпродуцента DLDH - штаму *O. polymorpha* «tr6», іммобілізованих у альгінатному гелі, для конструювання прототипів біореакторів для усунення D-лактату. Показано, що ефективність ензиматичної конверсії D-лактату залежить від швидкості потоку зразка через колонку. Після етапу оптимізації і удосконалення, розроблені прототипи біореакторів можуть бути апробовані в пілотному режимі для ферментованих харчових продуктів.

#### **3.4.4 Підсумки**

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 молочнокислих продуктів. Показано, що ефективність усунення D-лактату 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 молочнокислих продуктах.

Результати досліджень, описані в розділі 3.4, опубліковано в статтях [196, 197].

### **3.5. Створення нових ензиматично-спектрофотометричних методів аналізу L- та D-лактату на основі L- та D-лактат:ферицитохром с-оксидоредуктаз рекомбінантних штамів *O. polymorpha***

За рівнем молочної кислоти в крові діагностують діабет, гіпоксію, ацидоз, деякі гострі серцево-судинні захворювання, рівень токсичності ліків [1]. Тестування цього метаболіту в крові спортсменів використовують для моніторингу фізичного навантаження з метою забезпечення оптимальних тренувальних режимів. Водночас, важливість визначення лактату не лімітується лише медичним сектором та потребами спортивної медицини. D- і L-лактат є також компонентами багатьох харчових продуктів і напоїв. Молочнокислі бактерії природньо продукують L- і D-лактат, тому вони присутні в багатьох ферментованих молочних продуктах, зокрема, йогурті, кефірі, сирах, а також у ферментованих овочах. L-лактат часто додають до харчових продуктів для підкреслення смаку і як підкислювач. Водночас, підвищення вмісту лактату у деяких продуктах є ознакою їх псування [198]. Якість молока, пива, вина, фруктових і овочевих соків можна оцінити, визначаючи вміст L- і D-молочних кислот. D-лактат у високих концентраціях є токсичним для дітей і людей зі синдромом короткого кишківника і погіршує стан хворих на енцефалопатії.

Розроблені ензиматичні методи аналізу лактату найчастіше базуються на використанні  $\text{NAD}^+$ -залежної лактатдегідрогенази (ЛДГ) із м'язів або серця ссавців (КФ 1.1.1.27) [109, 110], бактерійної лактатоксидази (ЛО) (КФ 1.13.12.4) [79] або біензимної системи - пероксидази (ПО) і ЛО [82, 199]. Ці методи визначення базуються на ензиматичному окисненні лактату до пірувату ферментом ЛДГ із наступним спектрофотометричним визначенням  $\text{NADH}$  [74, 85] або колориметричним моніторингом пероксидазного [86] або безпероксидазного окислення хромогену, із використанням ЛО, з утворенням

забарвленого продукту [75]. Усі описані методи на основі  $\text{NAD}^+$ -залежної ЛДГ мають низку недоліків: неабсолютна селективність, необхідність використання екзогенного кофактору та додаткових піруват-зв'язуючих реагентів (наприклад, гідразину або 2-аміно-2-метил-1,3-пропанодіолу) чи ферментів (аланін-амінотрансферази), що додатково підвищує вартість методів та ускладнює процедуру аналізу. Недоліками використання лактатоксидазних методів визначення лактату є їх дороговизна, тривалий час проведення аналізу та певний інтерферуючий вплив при високому вмісті білків у досліджуваних зразках (крові) [86]. Ці факти переконливо демонструють потребу в опрацюванні нових ефективних інструментів для аналізу L- і D-лактату в клінічній діагностиці, медицині та харчових технологіях.

### **3.5.1. Створення нових ензиматично-фотометричних методів аналізу L-лактату на основі ФЦ $b_2$ *O. polymorpha***

#### **3.5.1.1. Розробка нового фотометричного методу аналізу L-лактату на основі ФЦ $b_2$ та «Берлінської блакиті»**

Запропонований нами новий аналітичний ферментативний метод визначення вмісту L-лактату у біологічних рідинах працює наступним чином. Ензиматичне окислення L-лактату поєднується із неензиматичною реакцією між фероціанідом  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4+}$ , генерованим внаслідок ензиматичної реакції, та іонами заліза (III). Внаслідок цих взаємодій утворюється інтенсивно забарвлений продукт – «Берлінська блакить» (Рис. 3.27).

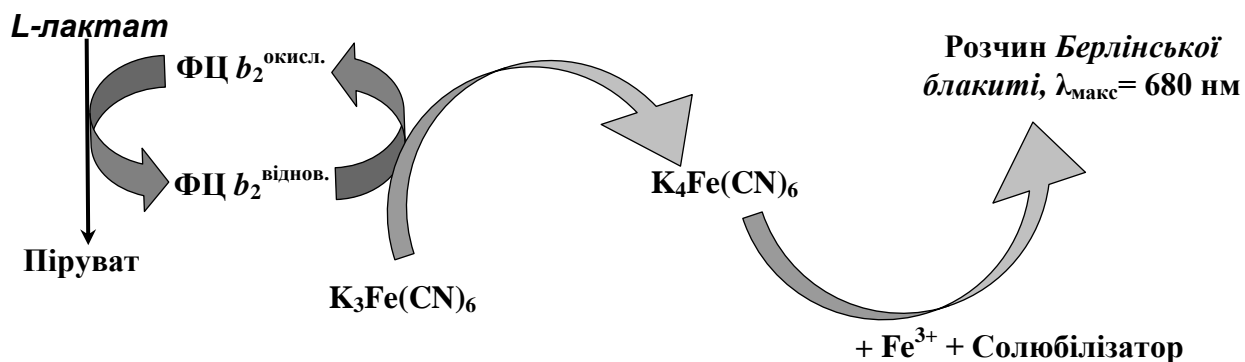


Рис. 3.27. Схематичне зображення принципу визначення L-лактату ензиматичним методом на основі ФЦ  $b_2$  та утворення «Берлінської блакиті».

Цей принцип був вперше застосований нами для розробки дуже чутливого методу візуалізації ферментативної активності ФЦ  $b_2$  після проведення нативного електрофорезу [164]. Через надзвичайно низьку розчинність «Берлінської блакиті» у водному розчині, її використання в колориметричному аналізі є практично неможливим, і тільки завдяки специфічному солубілізатору (щавлевій кислоті), який забезпечує переведення «Берлінської блакиті» в розчинну форму, такий аналіз став можливим.

Реакційна суміш для проведення колориметричного аналізу складається з 25 мМ фосфатного буфера, рН 7,7, та з наступних інгредієнтів з кінцевою концентрацією:

- 3 мМ фериціанід калію ( $K_3Fe(CN)_6$ );
- 20 мМ хлорид заліза (III) в 30 мМ HCl;
- 0,5 М щавлева кислота;
- ФЦ  $b_2$  з активністю 0,023 од.·мл<sup>-1</sup>.

Таке співвідношення компонентів було визначено експериментально для забезпечення найкращих біоаналітичних характеристик методу: максимальної чутливості, широкого діапазону лінійності та стабільності кольорового продукту.

Визначення довжини хвилі, що відповідає максимуму поглинання реакційної суміші, проводилось на спектрофотометрі SHIMADZU UV-1650 PC у видимому діапазоні з використанням стандартного програмного забезпечення “*UVProbe 2.20*”. Показало, що максимум абсорбції реакційної суміші припадає на 680 нм (Рис. 3.28).

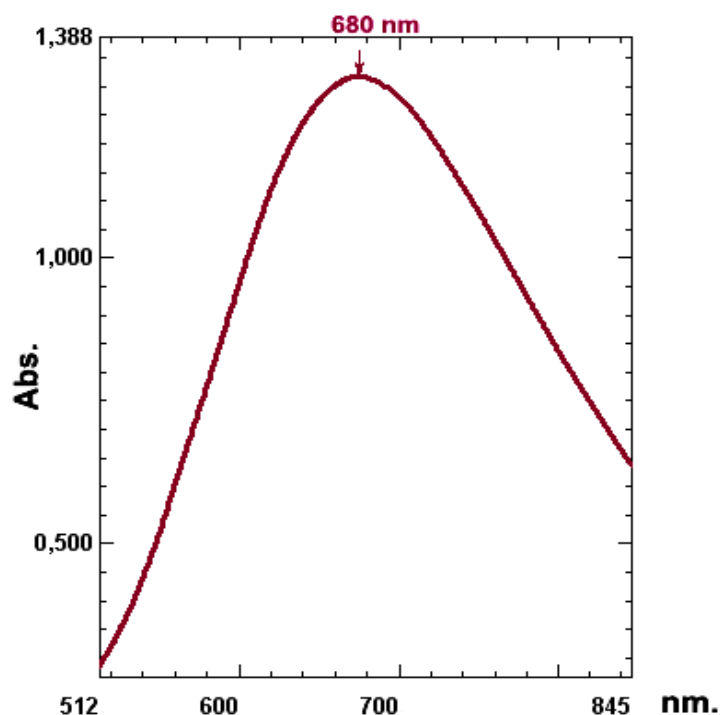


Рис. 3.28. Спектр світлопоглинання реакційної суміші для ферментативного методу аналізу L-лактату.

Саме при довжині хвилі 680 нм спостерігається найвища чутливість визначення L-лактату розробленим нами методом.

Хід аналізу запропонованим методом включає наступні операції:

Змішували 0,68 мл 25 мМ фосфатного буферу, рН 7,7; 0,1 мл 30 мМ  $K_3Fe(CN)_6$  та 0,02 мл ФЦ  $b_2$  (з об'ємною активністю 1,1 Од·мл<sup>-1</sup>). Запускали реакцію додаванням 0,2 мл досліджуваного зразка. Реакцію проводили в затемненому місці протягом 30 хв при температурі 25 °С. Ферментативну реакцію зупиняли додаванням реагенту - 0,3 мл 200 мМ  $FeCl_3$  в 30 мМ  $HCl$ , який



водночас приводить до утворення кінцевого кольорового продукту – «Берлінської блакиті». Для його солюбілізації вносили 1,7 мл 0,9 М щавлевої кислоти. Вимірювання оптичної густини реакційної суміші проводили на спектрофотометрі СФ-46 в кюветі на 3 мл (оптичний шлях 1 см), при 525 нм проти «сліпої» проби (додавались усі компоненти, крім дослідного зразка, а замість нього - 0,2 мл дистильованої води). Концентрацію L-лактату у реальних зразках визначали за калібрувальною кривою, побудованою на основі модельних водних розчинів L-лактату. Слід зазначити, що оптична густина реакційної суміші після внесення щавлевої кислоти залишалась стабільною протягом 30-40 хвилин.

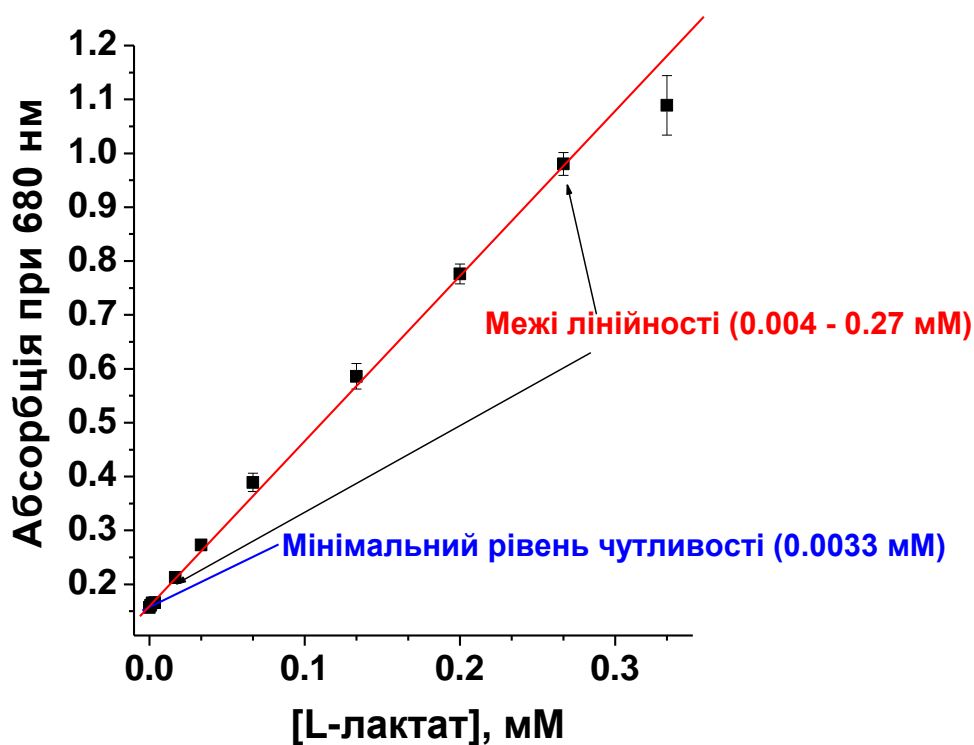


Рис. 3.29. Залежність оптичної густини реакційної суміші від концентрації L-лактату та діапазон лінійності розробленого методу.

Оптимізовані умови проведення аналізу L-лактату забезпечують лінійність методу в діапазоні 0,004-0,27 мМ L-лактату. Порогова чутливість методу є близькою 3,3 мкМ L-лактату (Рис. 3.29).

Розроблений метод кількісного визначення L-лактату захищено авторськими правами, зокрема, патентом на корисну модель України та Міжнародним патентом на винахід [200, 201].

### **3.5.1.2. Опрацювання протоколів неінвазивного визначення вмісту L-лактату в біологічних рідинах людини ензиматично-фотометричним методом на основі ФЦ $b_2$ та «Берлінської блакиті»**

Неінвазивне визначення метаболітів в слині, сечі та поті стає все більш актуальним, оскільки дозволяє уникати ризиків при маніпуляціях із кров'ю і страху болю пацієнтів від проколювання. Переваги неінвазивного аналізу полягають також у простоті та можливості більш частого відбору зразків з набагато меншим стресом для пацієнта. Окрім того, неінвазивні методи аналізу L-лактату дозволяють вирішити два важливі медико-соціальні завдання: моніторинг основних біохімічних і функціональних показників та створення дистанційних аларм-систем. Останні можуть виявитися дуже корисними як засіб постійного моніторингу з центру, наприклад з лікарні чи поліклініки, за певними групами хворих (з цукровим діабетом та ін.) і надання своєчасної допомоги при критичних станах.

Для неінвазивного ензиматичного методу визначення вмісту L-лактату в зразках поту людини використовували розроблений нами раніше метод на основі ФЦ  $b_2$ . Метод базується на формуванні, внаслідок поєднання ензиматичної та хімічної реакцій, кольорового продукту – розчинної форми «Берлінської блакиті» та його детекції при 680 нм [200, 201]. Перевагою запропонованого методу є його дешевизна і нетоксичність реагентів, а також простота в експлуатації.

Кількісне визначення L-лактату проводили із використанням калібрувальної кривої в межах її лінійності (Рис. 3.30).

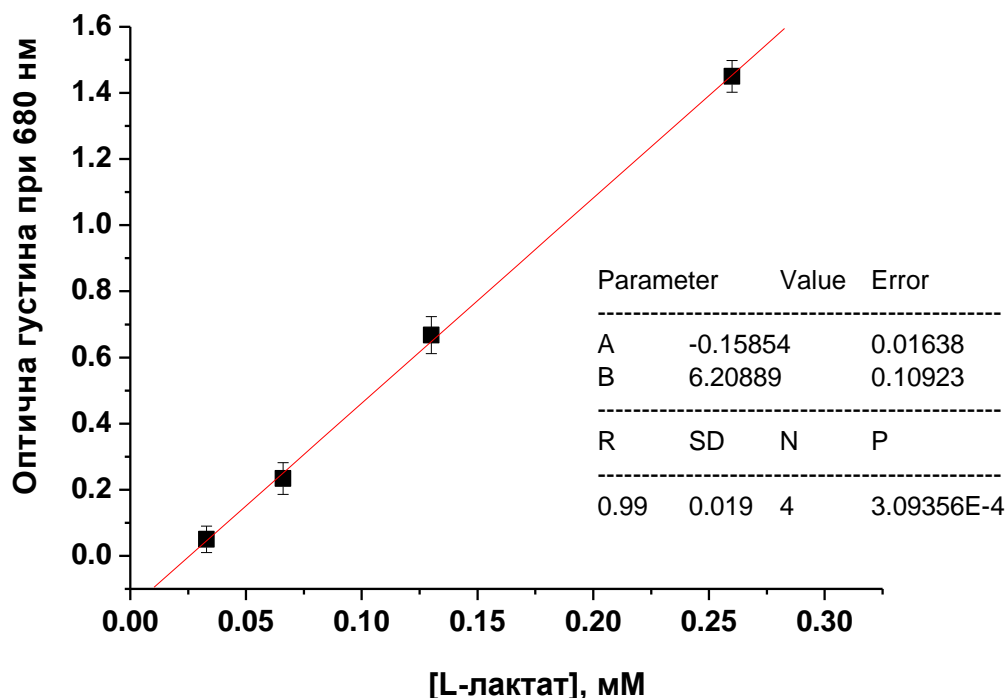


Рис. 3.30. Калібрувальна крива визначення вмісту L-лактату за допомогою ензиматичного методу на основі ФЦ  $b_2$ .

В експерименті брало участь 4 спортсмени на базі Львівського державного університету фізичної культури (стать: чоловіча, вік:  $19,8 \pm 1,9$  роки, маса тіла:  $69,5 \pm 1,1$  кг, зріст:  $170 \pm 5$  см). Зразки відбирали за допомогою паперових фільтрів діаметром 4,5 см, шляхом його поміщення на 1 хв. у зону пахв спортсменів. Зразки відібрали перед початком тренувань, коли спортсмен знаходився у стані спокою (К), після розминки (1), під час першої основної частини (три раунди боксування по 5 хв) – (2), другої основної частини (шість раундів боксування по 10 хв.) – (3) та під час заключної частини (вправи зі скакалкою) - (4). Кожен фільтр до і після витримки на тілі, зважували на аналітичній вазі, переносили в окремий герметичний пластиковий контейнер і

зберігали при  $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ , до часу проведення аналізу. Зразки були відібрані протягом тижня під час трьох незалежних тренувань.

Екстракцію L-лактату здійснювали з фільтрів 2 мл 25 мМ фосфатного буферу, рН 7,8. Отримані екстракти використовували для визначення L-лактату у поті спортсменів. Одержані дані наведено в табл. 3.10.

Табл. 3.10.

Усереднені значення концентрації L-лактату (мМ) в зразках поту трьох спортсменів за використання різних методів аналізу (ензиматичний на основі ФЦ  $b_2$ ; Хімічний Бюхнера; ЛДГ – ензиматичний за використання  $\text{NAD}^+$ -залежної ЛДГ). Позначення: **(К)** - зразки відібрані у стані спокою (контроль); **(1)** - після розминки; **(2)** - під час основної частини (три раунди боксування); **(3)** - після 15 хв. (шість раундів боксування); **(4)** - під час заключної частини тренування

Зразок Метод	К, мМ	1, мМ	2, мМ	3, мМ	4, мМ
ФЦ $b_2$	$13,1 \pm 1,8^*$ ( $p \geq 0,05$ )	$21,6 \pm 1,7^*$ ( $p \geq 0,05$ )	$38,2 \pm 10,4^*$ ( $p \geq 0,05$ )	$50,5 \pm 8,9^*$ ( $p \geq 0,05$ )	$73,8 \pm 14,6^*$ ( $p \geq 0,05$ )
Хімічний Бюхнера	$19,2 \pm 3,1^*$ ( $p \geq 0,05$ )	$35,0 \pm 7,1^{**}$ ( $p \leq 0,05$ )	$49,4 \pm 3,1^{**}$ ( $p \leq 0,05$ )	$68,5 \pm 15,1^{**}$ ( $p \leq 0,05$ )	$107,0 \pm 6,2^{**}$ ( $p \leq 0,05$ )
ЛДГ	$14,3 \pm 1,1^*$ ( $p \geq 0,05$ )	$25,2 \pm 1,4^*$ ( $p \geq 0,05$ )	$29,6 \pm 1,6^*$ ( $p \geq 0,05$ )	$52,5 \pm 4,1^*$ ( $p \geq 0,05$ )	$71,5 \pm 9,3^*$ ( $p \geq 0,05$ )

\* дані при порівнянні ФЦ  $b_2$  та ЛДГ методів співпадають (різниця статистично невірогідна ( $p \geq 0,05$ )); \*\* різниця при порівнянні ФЦ  $b_2$ -методу з Хімічним методом Бюхнера статистично вірогідна ( $p \leq 0,05$ )

Як свідчать результати, контрольне значення L-лактату, перед вправами (без навантаження), було  $13,1 \pm 1,8$  мМ. Референтні методи (хімічний Бюхнера і

лактатдегідрогеназний (ЛДГ)) показали близькі значення  $19,2 \pm 3,1$  і  $14,3 \pm 1,0$  мМ, відповідно (Табл. 3.10). Підвищене значення вмісту L-лактату, отримане методом Бюхнера, порівняно з розробленим підходом та ЛДГ, можна пояснити низькою селективністю хімічного методу в порівнянні з ензиматичними методами на основі ФЦ  $b_2$  та ЛДГ.

Вміст лактату у зразках поту спортсменів збільшився у 5,6 раза під час вправ. Це пояснюється зменшенням рівня кисню в м'язах, що веде до переважання анаеробного гліколізу і накопичення молочної кислоти. Отримані дані добре узгоджуються з описаними в літературі [202-204]. У всіх випадках спостерігається збільшення концентрації лактату протягом тренування, проте певна різниця значень для кожного спортсмена обумовлена залежністю від віку, індексу маси тіла, стану тренуваності, складу і рівня потовиділення (Рис. 3.31).

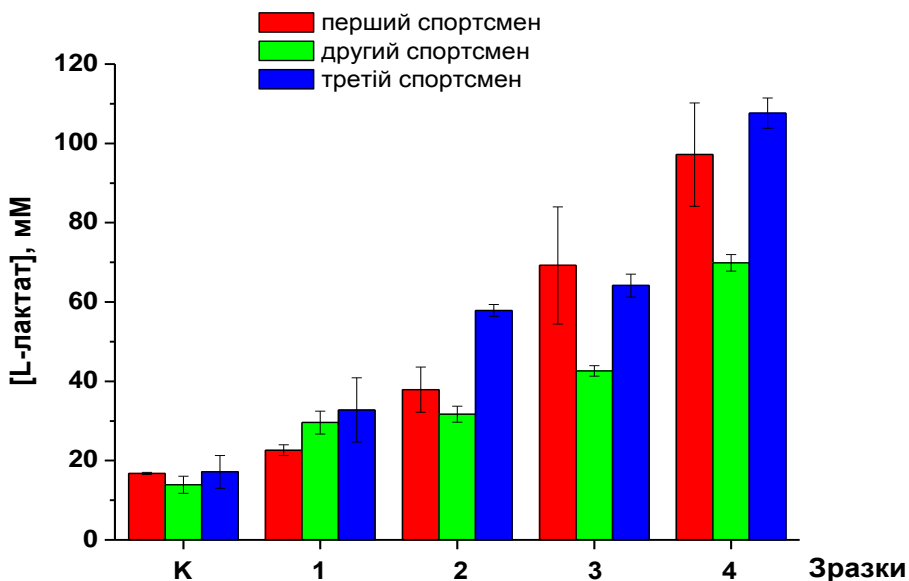


Рис. 3.31. Залежність вмісту L-лактату в поті досліджуваних спортсменів під час фізичного навантаження різного ступеню складності. Хід тренування: (К) - зразки відібрані у стані спокою (контроль); (1) - після розминки; (2) - під час основної частини (три раунди боксування); (3) - після 15 хв. (шість раундів боксування); (4) - під час заключної частини тренування.

Вміст лактату в поті спортсменів коливався в межах від 13 до 107 мМ, у залежності від інтенсивності фізичного навантаження (Рис. 3.31). Отримані результати добре узгоджуються із даними літератури, де наводяться рівні коливань вмісту L-лактату в межах від 16,1 до 110,3 мМ [205, 206].

Окрім неінвазивного моніторингу рівня L-лактату у зразках поту спортсменів, було опрацьовано протоколи неінвазивного моніторингу L-лактату у слині здорових людей без додаткових фізичних навантажень.

Зразки біологічного матеріалу були люб'язно надані співробітниками відділу аналітичної біотехнології Інституту біології клітин НАН України: 5 осіб жіночої статі віком від 23 до 59 років та 1 чоловік у віці 35 років, які є практично здоровими, не мають шкідливих звичок, не займаються систематично спортом.

Збір досліджуваного матеріалу проводили зранку до прийому їжі. Зразки слини було зібрано у пластикові пробірки, перед відбором волонтери випивали 70 мл води і прополікували ротову порожнину. Відібрані проби заморожували і зберігали при  $-20^{\circ}\text{C}$  до проведення аналізу. Перед аналізом зразки розводили у 2–4 рази ФБ 30 мМ, рН 7,5. Для дослідження кореляції отриманих результатів L-лактату у слині із рівнем молочної кислоти в крові, було проведене визначення відповідного аналіту у сироватці крові тих же ж осіб.

Кров для аналізу відбирали із вени у стандартні пробірки фірми VACUTE (США), які містили гель, що після центрифугування при 4800 g протягом 15 хв. відділяв сироватку від клітинних компонентів крові. Процес приготування проб для аналізу лактату передбачав осадження білків 50 % ТХО до кінцевої концентрації 5 %, білковий осад відокремлювали центрифугуванням при 8500 g впродовж 15 хв. Супернатант відбирали, нейтралізували кислоту 4 М КОН до рН  $\approx 8,0$ . Зразки заморожували і зберігали до проведення аналізу при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Аналіз лактату проводили методом на основі ФЦ  $b_2$  та «Берлінської блакиті». Розрахунок вмісту лактату здійснювали за допомогою калібрувального графіка, побудованого з використанням L-лактату натрію (Табл. 3.11).

Табл. 3.11.

Середні значення концентрації L-лактату в зразках слини та крові 6-и осіб різного віку, отримані ензиматично-фотометричним методом на основі ФЦ  $b_2$  та «Берлінської блакиті»

Зразок, (вік донора)	Вміст лактату в слині, мМ	Вміст лактату в сироватці крові, мМ
1 (59 р.)	1,95 ± 0,12	5,50 ± 0,37
2 (23 р.)	0,88 ± 0,46	2,36 ± 0,04
3 (26 р.)	1,38 ± 0,32	2,18 ± 0,01
4 (26 р.)	0,9 ± 0,14	2,81 ± 0,01
5 (30 р.)	1,04 ± 0,23	2,48 ± 0,33
6 (35 р.)	0,91 ± 0,27	1,99 ± 0,04

Отримані величини вмісту L-лактату в зразках слини 6-и осіб коливаються в межах значень від 0,88 до 1,95 мМ, що добре корелює із літературними даними [207]. Водночас, чіткого співвідношення між результатами визначення L-лактату в слині та сироватці крові ми не спостерігали. Так, для особи жіночої статі віком 26 років, вміст L-лактату в сироватці венозної крові становив 2,18, а у слині - 1,38 мМ (співвідношення 1,6 : 1). У той же час, у жінки віком 59 років при значенні лактату 5,5 мМ у сироватці рівень в слині відповідав 1,95 мМ (співвідношення 2,8 : 1). Проте, для більшості осіб із вибірки (4-и особи) співвідношення рівня венозного лактату та лактату у слині становило 2,5 : 1.

### 3.5.1.3. Розробка способу повторного використання фермента, іммобілізованого на комерційних магнітних мікрочастинках, для ензиматичного визначення L-лактату

Нано- та мікроструктуровані матеріали часто володіють унікальними структурними, електричними, хімічними та магнітними властивостями, що дозволяє використовувати їх в сучасній техніці, включаючи носії для зберігання інформації та як біодатчики у біомедичній інженерії. Мікрочастинки, що володіють магнітними властивостями, мають особливі переваги, оскільки можуть забезпечити селективне приєднання до біологічних молекул із наданням їм магнітних властивостей, що дозволяє сепарувати ці речовини (Рис. 3.32) або адресно транспортувати в певні тканини тіла під дією магнітного поля.



Рис. 3.32. Зображення процесу осадження функціоналізованих магнітних мікрочастинок у магнітному полі.

Для з'ясування можливості повторного використання ФЦ  $b_2$  при проведенні кількісного визначення L-лактату за допомогою розробленого раніше методу було проведено іммобілізацію фермента на поверхні магнітних мікрочастинок (Fe-МЧ).

Для іммобілізації ФЦ  $b_2$  методом іонних взаємодій використано комерційні магнітні мікрочастинки на основі оксиду заліза покриті силаном «BioMag<sup>®</sup> Plus



particles» розміром 1 мкм, функціоналізовані аміногрупами (“Micro particles, magnetic, amino functionalized, Sigma-Aldrich”).

Суспензію магнітних мікрочастинок концентрацією 50 мг·мл<sup>-1</sup> при рН 7,0 розводили до кінцевої концентрації 1,5 мг·мл<sup>-1</sup> та вносили рівний об’єм очищеного препарату фермента з активністю 3,75 Од·мл<sup>-1</sup> та концентрацією білка 1,5 мг·мл<sup>-1</sup>. Отриману суспензію загальним об’ємом 400 мкл інкубували протягом 1,5 год. при + 8 °С для іммобілізації фермента на магнітному носії. Після інкубації, біофункціоналізовані магнітні мікрочастинок осаджували у магнітному полі та двічі промивали 50 мМ фосфатним буфером рН 7,5. Ефективність зв’язування ФЦ *b*<sub>2</sub> на комерційних феромагнітних мікрочастинок оцінювали за активністю фермента (за температури 30° С) на різних стадіях іммобілізації (Табл. 3.12).

Табл. 3.12.

Активність ФЦ *b*<sub>2</sub> в ході іммобілізації на поверхні комерційних феромагнітних мікрочастинок (Fe-МЧ). Наведено дані для типового експерименту

	Розчин фермента до іммобілізації	Промивні розчини		Супернатант після іммобілізації	Іммобілізований на Fe-МЧ фермент
		I	II		
V, мл	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
C <sub>білка</sub> , мг·мл <sup>-1</sup>	1,5	0,05	0,07	0,77	0,6
A, Од·мл <sup>-1</sup>	11,25	-*	-*	1,74	19,5
∑A, Од.	4,5	-	-	0,67	7,8
Вихід, (%)	=100	0	0	15	173

\* поза межею визначення

Як впливає з даних табл. 3.12, близько 85 % фермента (за об’ємом) зв’язується з Fe-МЧ, причому в процесі іммобілізації зростає активність

фермента в 1,73 раза, що, вірогідно, зв'язано з відокремленням компонентів грубого препарату ФЦ  $b_2$ , які гальмують ферментну активність.

Для отриманих ФЦ  $b_2$ -Fe-МЧ та вихідного препарату фермента в розчині досліджено стабільність фермента при зберіганні протягом 4 днів при + 4 °С (Рис. 3.33).

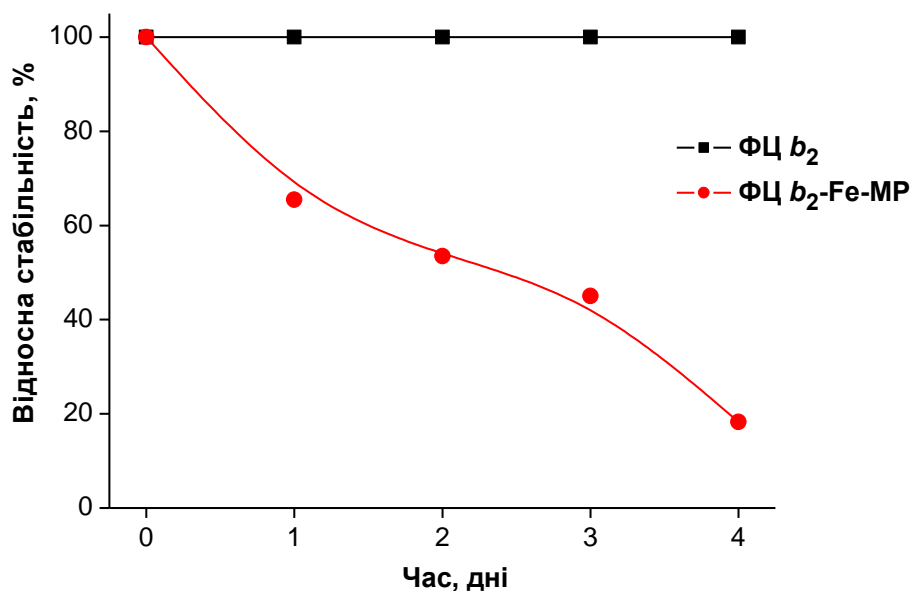


Рис. 3.33. Стабільність при зберіганні ФЦ  $b_2$ -Fe-МЧ «BioMag® Plus particles» та вільного ФЦ  $b_2$  (контроль). Наведено дані для типового експерименту.

Час напівінактивації ФЦ  $b_2$ -Fe-МЧ, припадає приблизно на третю добу зберігання. Активність ФЦ  $b_2$  в розчині, використаного в ролі контролю, не змінилась протягом досліджуваного періоду. Чому іммобілізований на Fe-МЧ фермент є менш стабільний, ніж у розчині - невідомо. Можливо, негативний вплив на фермент мають йони  $Fe^{3+}$ , які можуть знаходитись у рівновазі із мікрочастинками оксиду заліза, та генерувати радикали (в реакції Фентона), токсичні для холоферменту. Безперечно, ця гіпотеза потребує додаткових експериментів.

Препарат ФЦ  $b_2$ -Fe-МЧ з активністю  $6,5 \text{ Од} \cdot \text{мл}^{-1}$  було використано для з'ясування можливості повторного використання ферменту в ензиматичній реакції визначення L-лактату.

Препарат ФЦ  $b_2$ -Fe-МЧ після інкубації в реакційній суміші для аналізу L-лактату відділяли від рідини в магнітному полі, а до супернатанту вносили реагенти, які забезпечують формування барвника та його розчинність. Відібрані ФЦ  $b_2$ -Fe-МЧ повторно вносили в реакційну суміш для проведення ензиматичної реакції в наступній серії аналізу. Залежність оптичної густини реакційної суміші із різною концентрацією L-лактату від повторного використання ФЦ  $b_2$ -Fe-МЧ як каталізатора в складі ензиматично-фотометричного методу наведено на Рис. 3.34.

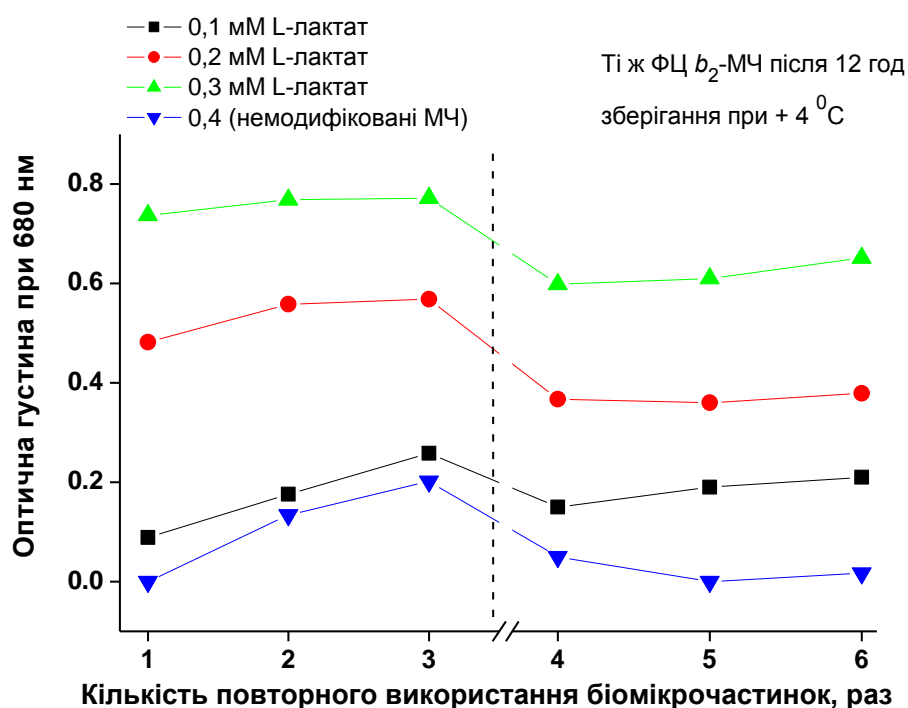


Рис. 3.34. Залежність оптичної густини реакційної суміші при визначенні L-лактату ензиматично-фотометричним методом при повторному використанні ФЦ  $b_2$ -Fe-МЧ. Вимірювання проводили проти проби із ФЦ  $b_2$ -Fe-МЧ без додавання L-лактату. Наведено дані для типового експерименту.

Протестовано різні концентрації L-лактату, які знаходяться в діапазоні лінійності набору. Як видно з Рис. 3.34, зміна оптичної густини реакційної суміші при шестикратному повторному використанні ФЦ  $b_2$ -Fe-МЧ знижується незначно. Таким чином, ФЦ  $b_2$ -Fe-МЧ можна повторно використовувати для визначення L-лактату, принаймні, шестикратно з повторним рекалібруванням.

Отже, отримані результати підтверджують можливість використання комерційних магнітних мікрочастинок як носія ФЦ  $b_2$  для формування ензиматичних наборів із багатократним використанням фермента.

### **3.5.2. Вивчення можливості використання клітин *O. polymorpha* «tr6» як джерела дегідрогенази D-лактату для фотометричного аналізу D-лактату в рідинах**

#### **3.5.2.1. Розробка ензиматично-фотометричного аналізу D-лактату на основі утворення формазану як кольорового продукту**

За основу методу фотометричного кількісного аналізу D-лактату на основі пермеабілізованих клітин *O. polymorpha* «tr6» було використано принцип ферментативного відновлення нітротетразолієвого синього до кольорового продукту – формазану (у присутності феназинметасульфату як медіатора), з наступною детекцією оптичної густини [103]. Принципову схему окисно-відновних реакцій, що лягли в основу нового методу визначення D-лактату, представлено на Рис. 3.35.

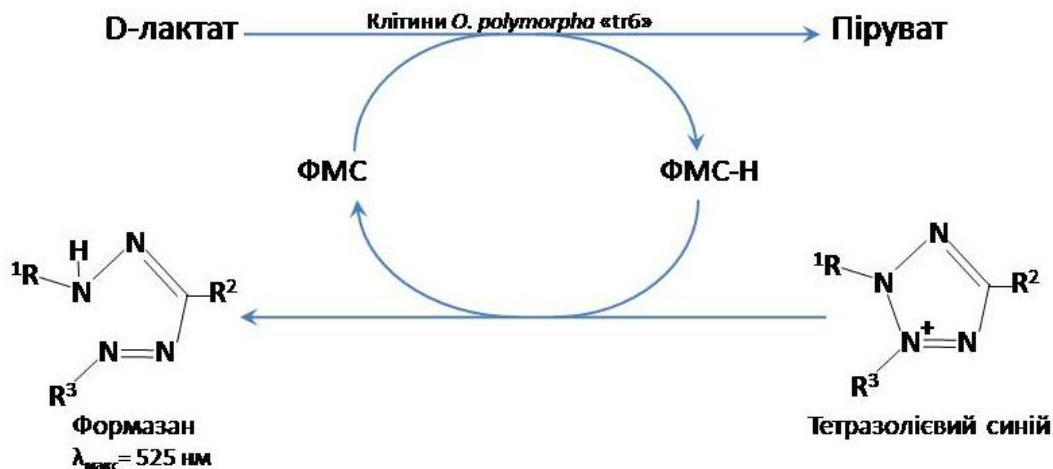


Рис. 3.35. Схема окисно-відновних реакцій при ензиматичному визначенні D-лактату з використанням пермеабілізованих клітин *O. polymorpha* «tr6». Позначення: ФМС – феназинметосульфат; ФМС-Н – його відновлена форма.

Метод ґрунтується на ферментативному окисленні D-лактату до пірувату з відновленням DLDH пермеабілізованих клітин *O. polymorpha* «tr6». Останній окислюється медіатором ФМС, з наступним перенесенням електронів на нітротетразолієвий синій. Нітротетразолієвий синій відновлюється до формазану і реакційна суміш набуває стабільного кольорового забарвлення. Залежно від концентрації D-лактату, забарвлення може варіювати від рожевуватого до насиченого вишневого.

Оптимальними умовами для утворення кольорового продукту - формазану: 50 мМ ФБ, рН 7,8, 1,5 мМ ФМС, 0,1 % нітротетразолієвий синій, 1 % тритон X-100, активність DLDH 1 Од·мл<sup>-1</sup> при температурі 25-30 °С протягом 1 год у темному місці. Зупинка реакції здійснювалась шляхом додавання 0,3 М НСІ (кінцева концентрація).

Визначення довжини хвилі для забезпечення максимуму поглинання реакційної суміші проводилось на спектрофотометрі SHIMADZU UV-1650 PC у

видимому діапазоні з використанням стандартного програмного забезпечення “UVProbe 2.20” (Рис. 3.36).

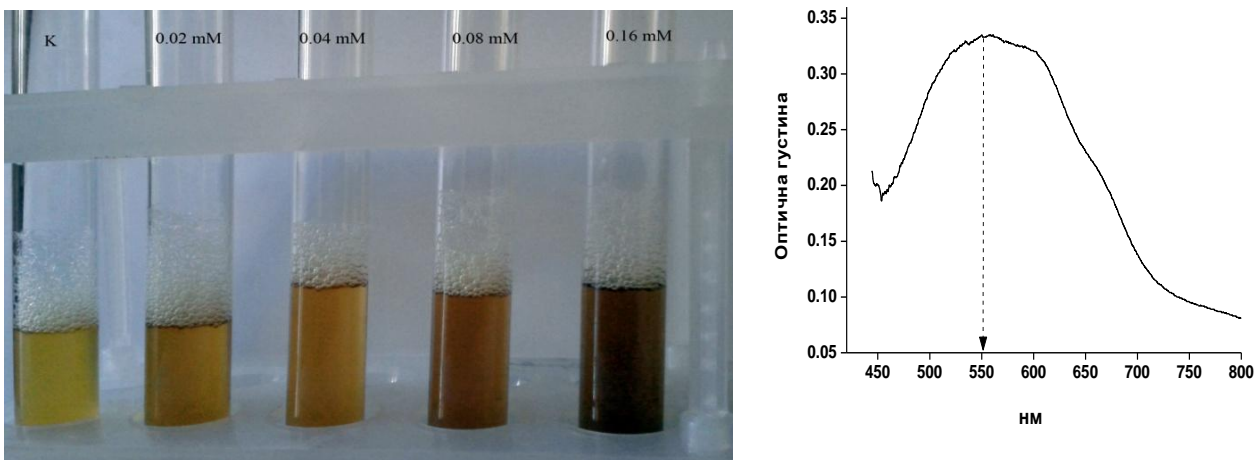


Рис. 3.36. Світлина калібрувальних проб до усунення пермеабілізованих клітин із реакційної суміші (зліва) та спектр світопоглинання кольорового продукту при аналізі D-лактату (справа) ензиматично-фотометричним методом на основі DLDH з утворенням формазану.

Максимум абсорбції реакційної суміші припадав на довжину хвилі 550 нм (Рис. 3.36), тому саме при цій довжині хвилі проводили фотометрування.

Вимірювання оптичної густини реакційної суміші проводили на спектрофотометрі в кюветі об'ємом 3 мл (оптичний шлях 1 см), при 550 нм проти “сліпої” проби (додавались усі компоненти, крім дослідного зразка, і 0,2 мл дистильованої води). Концентрацію D-лактату у реальних зразках визначали за калібрувальною кривою, побудованою на основі модельних водних розчинів D-лактату. Оптимізовані умови проведення аналізу D-лактату забезпечують лінійність методу в діапазоні 0,02-0,8 мМ D-лактату. Чутливість методу є близькою 5 мкМ D-лактату (Рис. 3.37).

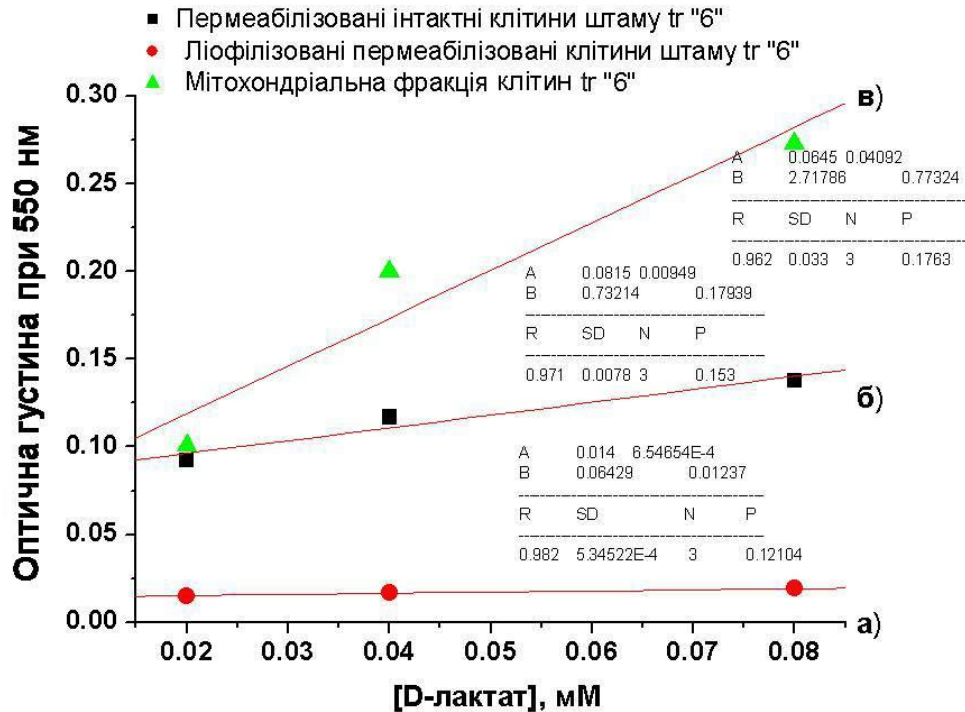


Рис. 3.37. Калібрувальна крива для визначення D-лактату за допомогою ензиматично-фотометричного методу на основі різних джерел DLDH з утворенням формазану. Позначення: (а) пермеабілізовані клітини *O. polymorpha* «trб»; (б) пермеабілізовані ліофілізовані клітини; (в) субклітинні фракції клітин, збагачені мітохондріями. Наведено дані для типового експерименту.

Із Рис. 3.37 випливає, що найефективніше джерело DLDH, яке забезпечувало найвищу оптичну густину реакційної суміші, є субклітинні фракції клітин, збагачені мітохондріями. Так, максимальна оптична густина на внесений 1,2 мМ D-лактат, при використанні субклітинної фракції клітин *O. polymorpha* «trб», збагаченої мітохондріями, відповідала 0,3 одиницям оптичної густини.

Для оцінки рівня ензиматичної конверсії аналіту до кінцевого продукту субклітинними фракціями клітин, збагаченими мітохондріями, проведено додаткове калібрування з використанням NADH як відновного агента для нітротетразолієвого синього (НТЗС). Для цієї процедури, умови реакції були

такими ж, як для аналізу L-лактату, за винятком внесення у реакційну суміш субклітинних фракцій клітин. Точну концентрацію стандартного розчину NADH розраховували шляхом вимірювання його оптичної густини при 340 нм ( $\epsilon_{\text{MM}}=6,23 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Калібрувальна крива для NADH у реакції ФМС + НТЗС + формазан показана на Рис. 3.38.

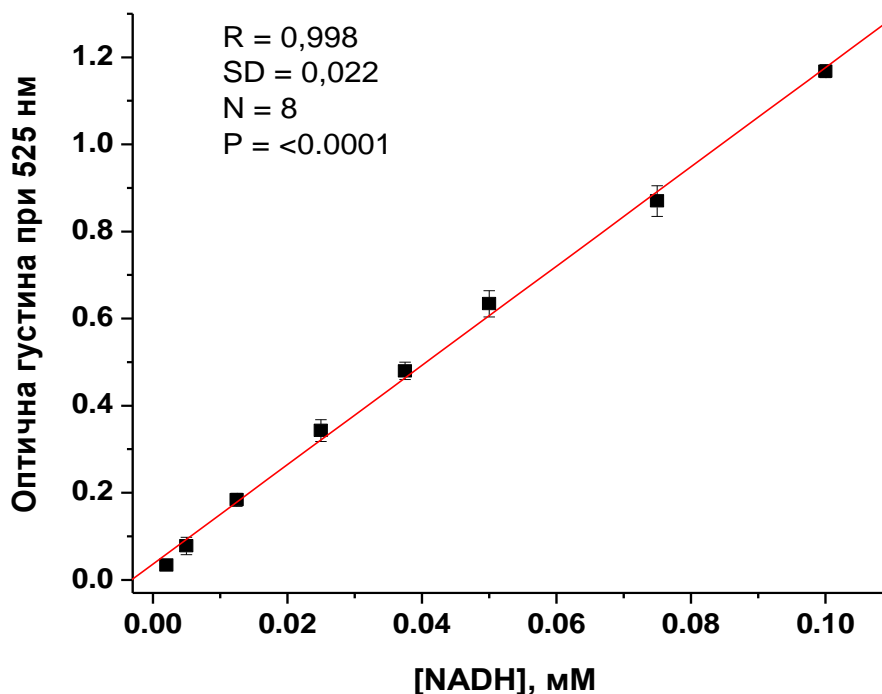


Рис. 3.38. Залежність оптичної густини реакційної суміші від концентрації NADH у фотометрованій суміші, використаного як калібранта в реакції NADH-ФМС-НТЗС.

На основі коефіцієнту мілімолярної екстинкції формазану, обрахованого із калібрувальної кривої для реакції NADH + ФМС + НТЗС ( $\epsilon_{\text{MM}}=11,5 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) (Рис. 3.38), ензиматична конверсія аналіту в досліджуваних умовах близька 33 %, що добре корелює із одиницями активності DLDH пермеабілізованих клітин *O. polymorpha* «trb», внесеними для забезпечення ензиматичної реакції.



### 3.5.2.2. Розробка ензиматичного аналізу D-лактату на основі утворення розчинної форми «Берлінської блакиті»

При вивченні можливості використання клітин *O. polymorpha* «tr6» як джерела дегідрогенази D-лактату для фотометричного аналізу відповідного аналіту, було використано розроблені нами раніше підходи фотометричного аналізу L-лактату на основі утворення розчинної форми «Берлінської блакиті» [200, 201].

Реакційна суміш для проведення фотометричного аналізу складається з 25 мМ фосфатного буфера, рН 7,8 та з наступних інгредієнтів з кінцевою концентрацією:

- 3 мМ фериціанід калію  $K_3Fe(CN)_6$ ;
- 20 мМ хлорид заліза (III) в 30 мМ HCl;
- 0,5 М щавлева кислота;
- 0,03 Од·мл<sup>-1</sup> DLDH.

Таке співвідношення компонентів було визначено експериментально для забезпечення найкращих біоаналітичних характеристик методу: максимальної чутливості, широкого діапазону лінійності та стабільності кольорового забарвлення.

Визначення довжини хвилі для забезпечення максимуму поглинання реакційної суміші проведено на спектрофотометрі SHIMADZU UV-1650 PC у видимому діапазоні з використанням стандартного програмного забезпечення “UVProbe 2.20” (Рис. 3.39).

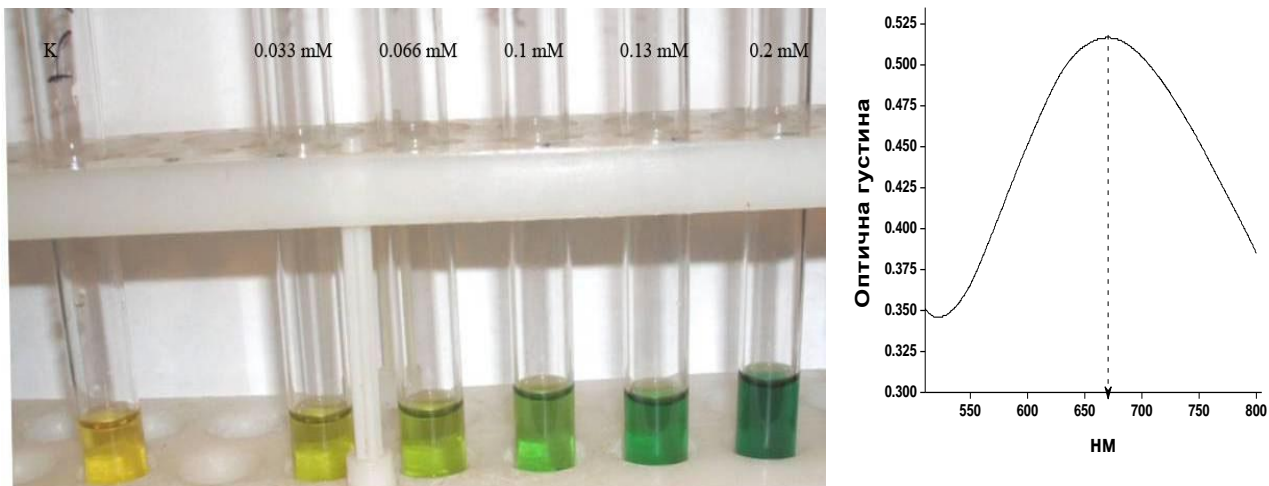


Рис. 3.39. Світлина калібрувальних проб після усунення пермеабілізованих клітин із реакційної суміші (зліва) та спектр світопоглинання кольорового продукту при аналізі D-лактату (справа) ензиматично-фотометричним методом на основі різних джерел DLDH та формування розчиненої форми «Берлінської блакиті».

Показано, що максимум абсорбції реакційної суміші припадає на довжину хвилі 680 нм. Саме при такій величині хвилі найкраще проводити визначення D-лактату пропонованим нами методом.

Аналіз здійснювали наступним чином. Змішували 0,68 мл 25 мМ фосфатного буферу, рН 7,8; 0,1 мл 30 мМ  $K_3Fe(CN)_6$  та 0,02 мл джерела DLDH (з об'ємною активністю  $1,1 \text{ Од} \cdot \text{мл}^{-1}$ ). Реакцію запускали додаванням 0,2 мл стандартного розчину D-лактату чи досліджуваного зразка. Реакцію проводили в затемненому місці протягом 60 хв при температурі 25 °С. Ферментативну реакцію зупиняли додаванням реагенту - 0,3 мл 200 мМ  $FeCl_3$  в 30 мМ  $HCl$ , який водночас приводить до утворення кінцевого кольорового продукту – «Берлінської блакиті». Для його солюбілізації вносили 1,7 мл 0,9 М щавлевої кислоти. Важливим етапом, що забезпечував точність вимірювання та відтворюваність результатів, було усунення клітинних біоелементів із

фотометричної суміші після зупинки ензиматичної реакції. Для цього, перед визначенням оптичної густини зразків, клітини осаджували центрифугуванням (5 хв при 3000 g, 4 °C). Супернатант відбирали для вимірювання оптичної густини реакційної суміші в кюветі на 3 мл (оптичний шлях 1 см), при 670 нм проти “сліпої” проби (додавались усі компоненти, крім дослідного зразка і 0,2 мл дистильованої води) (Рис. 3.40).

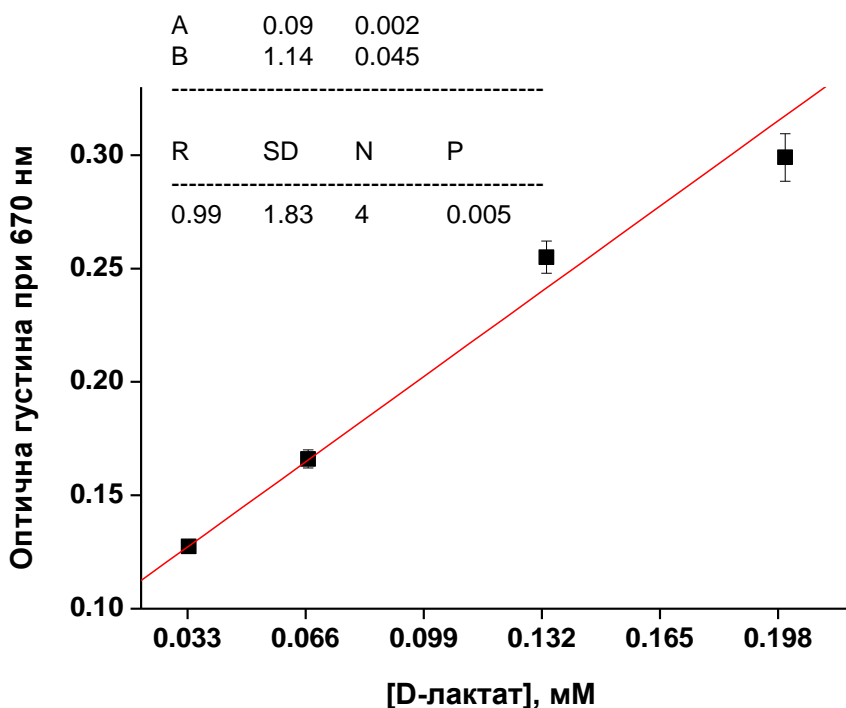


Рис. 3.40. Калібрувальна крива для визначення D-лактату за допомогою ензиматично-фотометричного методу на основі різних джерел DLDH з формуванням розчиненої форми «Берлінської блакиті».

Опрацьовані умови проведення аналізу D-лактату забезпечують лінійність методу в діапазоні 0,03 - 0,2 мМ D-лактату. Чутливість методу є близькою 3,6 мкМ D-лактату (Рис. 3.40). Слід зазначити, що оптична густина реакційної суміші за відсутності прямих сонячних променів залишалась стабільною протягом 15-20 хвилин після закінчення реакції.

Розроблений ензиматичний спосіб аналізу D-лактату було апробовано на реальних зразках молочних продуктів: 2,6 % молока "Селянське особливе" (було додатково ферментоване при +40 °С протягом 24 год.) та 1 % питного йогурту "Галичина". Перед аналізом, зразки молочної продукції було оброблено 5 % трихлороцтовою кислотою (кінцева концентрація), для усунення білкових фракцій методом центрифугування (15 хв при 12000 g та 4 °С). Після нейтралізації зразків 2 М NaOH до значення рН близького 7,5, зразки заморожували при -20 °С до подальшого їх використання. Для забезпечення максимальної точності визначення, аналіз проводили методом послідовного внесення стандартного розчину D-лактату на фоні зразку (у всі пробірки, окрім контролю, вносився розведений зразок після чого додавались зростаючі концентрації D-лактату) (Рис. 3.41).

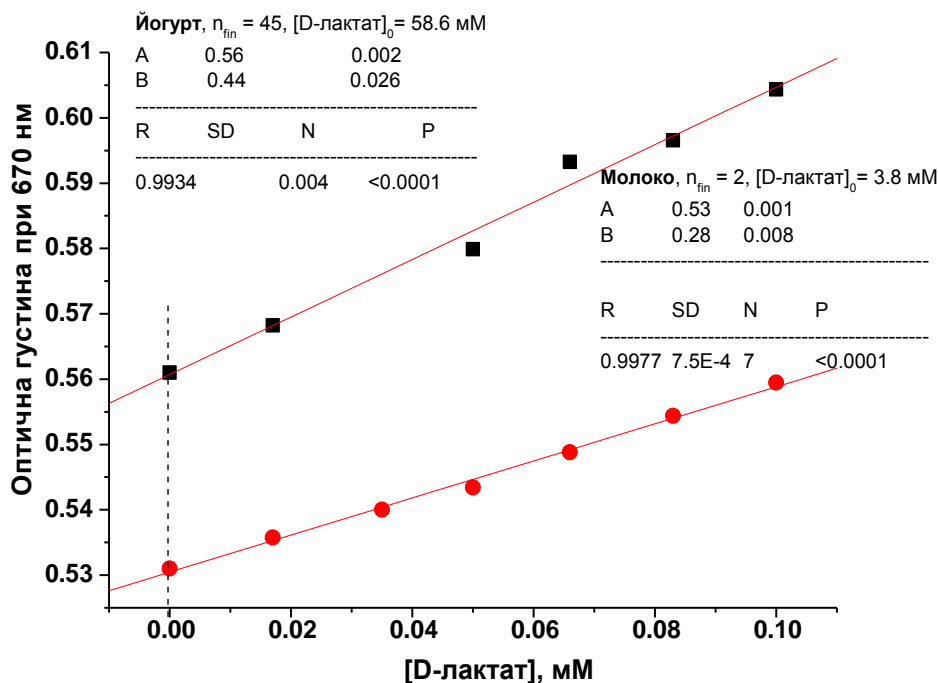


Рис. 3.41. Визначення вмісту D-лактату ензиматичним методом на основі утворення розчиненої форми «Берлінської блакиті» у присутності пермеабілізованих клітин *O. polymorpha* «tr6» як джерела DLDH,

використовуючи метод множинного внесення стандарту. Наведено дані для типового експерименту.

Аналізуючи вміст D-лактату в йогурті запропонованим ензиматичним методом, було отримано значення  $59,6 \pm 0,34$  мМ, а для ферментованого молока –  $3,8 \pm 0,25$  мМ D-лактату. Ці результати добре узгоджуються з літературними даними [100, 208] і, водночас, корелюють зі значеннями, отриманими за використання D-лактат-селективного біоелектроду (див. розділ 3.6.1.3), яке становить  $63,4 \pm 3,1$  мМ та  $3,1 \pm 0,57$  мМ D-лактату, відповідно (Табл. 3.13).

Табл. 3.13.

Апробація спектрофотометричного і біосенсорного підходів для визначення D-лактату в харчових продуктах



Зразок	Спектрофотометричний метод	Біосенсорний метод (див. розділ 3.6.1.3)
	[D-лактат], мМ	
Молоко ферментоване	$3,8 \pm 0,25$	$3,1 \pm 0,57$
Питний йогурт	$58,6 \pm 0,34$	$63,4 \pm 3,1$

Дані отримані за використання різних підходів спектрофотометричного і біосенсорного добре узгоджуються між собою та з даними літератури, тому після удосконалення можуть бути запропонованими для недорогого та швидкого кількісного визначення D-лактату в молочних продуктах.

### 3.5.3. Підсумки

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

Результати досліджень, описані в розділі 3.5, опубліковано в статтях [103, 191, 197, 200, 201, 209].

### 3.6. Створення амперометричних біосенсорів для аналізу лактату

Для аналізу молочної кислоти запропоновано багато фізико-хімічних та хімічних методів: спектрофотометрія [74, 85], флуориметрія [210], рН-потенціометрія [211]. Більшість із цих методів потребують значних затрат часу і попередніх лабораторних процедур із зразками, які включають, зокрема, фільтрацію, хроматографію, депротейнізацію і т.п. Крім того, більшість з них вимагають використання дорогого обладнання, висококваліфікованих працівників і не є селективними.

Використання амперометричних біосенсорів на основі ферментів є дуже перспективним завдяки вигідному поєднанню високої селективності біорозпізнаючого елемента та чутливості електрохімічного перетворювача. В основі описаних лактат-селективних ензиматичних біосенсорів, зазвичай, лежить використання  $\text{NAD}^+$ -залежної лактатдегідрогенази (ЛДГ) із м'язів ссавців [76] або бактерійної лактатоксидази (ЛО) [79, 212]. Негативним аспектом використання  $\text{NAD}^+$ -залежних біосенсорів є необхідність внесення в реакційну суміш цього коензиму та забезпечення відновлення його окисленої форми для

регенерації. Амперометричні сенсори на основі ЛО, як правило, ґрунтуються на використанні кисневого або пероксидноводневого платинових електродів, на яких відбувається катодне відновлення кисню або анодне окислення пероксиду водню, відповідно, електрохімічно активних сполук, споживання або утворення яких супряжені з лактатоксидазною реакцією [125, 212-214]. Недоліком відомих сенсорів на основі ЛО є чутливість до інтерферуючого впливу аскорбату та інших речовин, здатних до окислення при використанні високого електродного потенціалу (+600 мВ проти Ag/AgCl/3М КCl). Для зниження цього негативного впливу пропонуються додаткові підходи, зокрема, покриття біоселективної плівки мембранами із селективною проникністю [215]. Широко вживаним підходом для зниження високого робочого електродного потенціалу, необхідного для анодного окислення пероксиду водню, є використання системи опосередкованого розкладу  $H_2O_2$  в біоселективному шарі за участі пероксидази та різних синтетичних медіаторів електронного перенесення. При цьому, через посередництво різних редокс-медіаторів, створюються умови електрохімічного супряження пероксидази з електродними процесами, в результаті чого каталізоване пероксидазою відновлення  $H_2O_2$  і супряжене з ним окислення медіатора відбувається при низькому робочому потенціалі (-50 мВ проти Ag/AgCl/3М КCl) [82, 199, 216]. Проте, запропоновані підходи значно ускладнюють приготування сенсора і часто мають негативний вплив на біорозпізнаючий елемент.

Крім низької селективності та складності приготування, більшості запропонованих амперометричних біосенсорів притаманна відносно низька операційна стабільність, що вимагає подальшого пошуку нових біосенсорних технологій, які можуть суттєво покращити експлуатаційні характеристики біоелемента, забезпечити високу технологічність їх виготовлення та можливість інтеграції біочіпа в структуру аналізаторів широкого профілю.

Метою роботи було створення лабораторних прототипів амперометричних біосенсорів для кількісного визначення L- та D-лактату з використанням рекомбінантних мікробних джерел ФЦ  $b_2$  та DLDH *O. polymorpha*. Різні варіанти опрацьованих підходів вивчались з точки зору оптимізації перенесення електронів із відновленої форми ФЦ  $b_2$  та DLDH на кінцевий акцептор, підбору оптимальних умов проведення аналізу і забезпечення максимальної селективності, стабільності та точності результатів.

Амперометричні біосенсори створювались у трьохелектродній конфігурації (Рис. 3.42). Електродом порівняння служив срібло-хлорсрібний (Ag/AgCl/3MKCl) (Рис. 3.42, зліва), як допоміжний використовували стержневий платиновий електрод. Застосовували різні типи робочих електродів: на основі графітового стержня (тип RW001, діаметр 3,05 мм), скловидно-карбонового стержня (діаметр 3,25 мм), платинового дроту (діаметр 1 мм). У випадку використання комерційних планарних електродів, усі електроди трьохелектродної конфігурації розташовувались на керамічній підкладці (Рис. 3.42, справа).



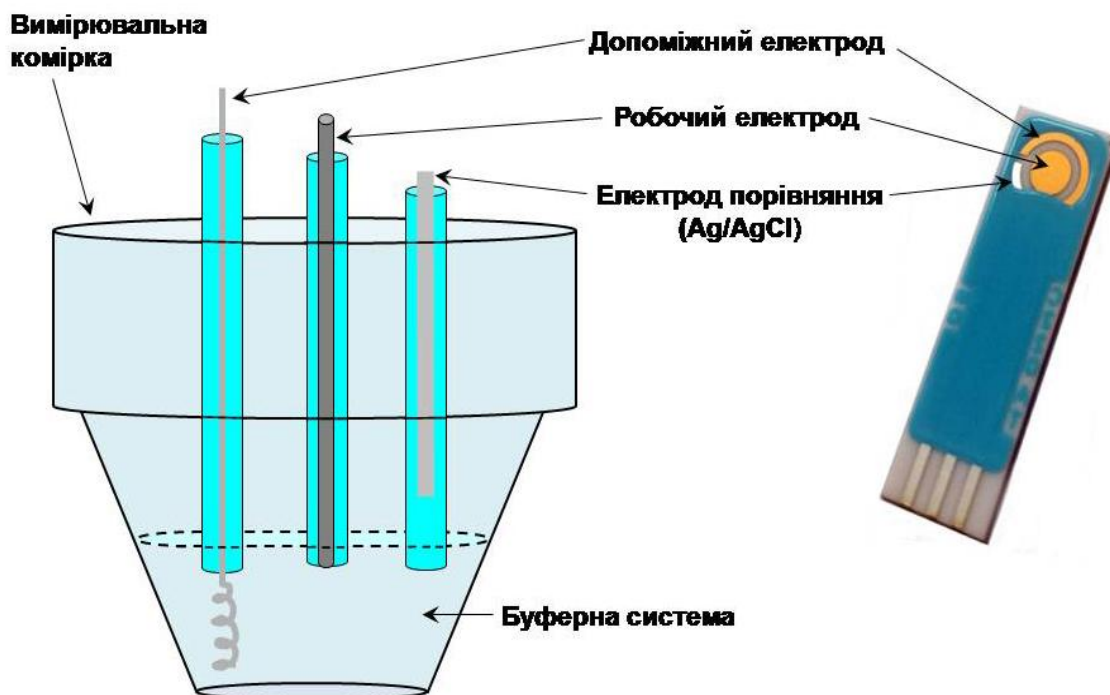


Рис. 3.42. Принципова схема трьохелектродної конфігурації амперометричного біосенсора (зліва) та комбінований планарний електрод трьохелектродної конфігурації (справа).

### 3.6.1. Конструювання амперометричних мікробних біосенсорів для визначення L- та D-лактату з використанням рекомбінантних клітин *O. polymorpha*

#### 3.6.1.1. Розробка мікробних біосенсорів на L-лактат з використанням пермеабілізованих клітин *O. polymorpha* «tr1» та електроосадженого полімера

Оскільки раніше нами було показано, що біосенсор на основі очищеного ФЦ  $b_2$  із *O. polymorpha* демонструє обмежену стабільність [217], нами було висунуте припущення, що використання дріжджових клітин в ролі біоелемента може суттєво поліпшити сенсорні характеристики за рахунок збереження ферменту в нативному середовищі. Тому, як біорозпізнаючий елемент

мікробного амперометричного сенсора на L-лактат, використовувались пермеабілізовані клітини надпродуцента ФЦ *b*<sub>2</sub> *O. polymorpha* «tr1».

Для іммобілізації пермеабілізованих дріжджових клітин на поверхні робочих електродів, було відібрано електроосаджений катодний полімер (CP9), синтезований в лабораторії електроаналітики та біосенсорики Рурського університету (м. Бохум, ФРН). При використанні катодних полімерів застосовують наступну схему катодного електроосадження: -1200 мВ – 0,2 с та 0 мВ 5 с (Рис. 3.43, Б) [166, 167].

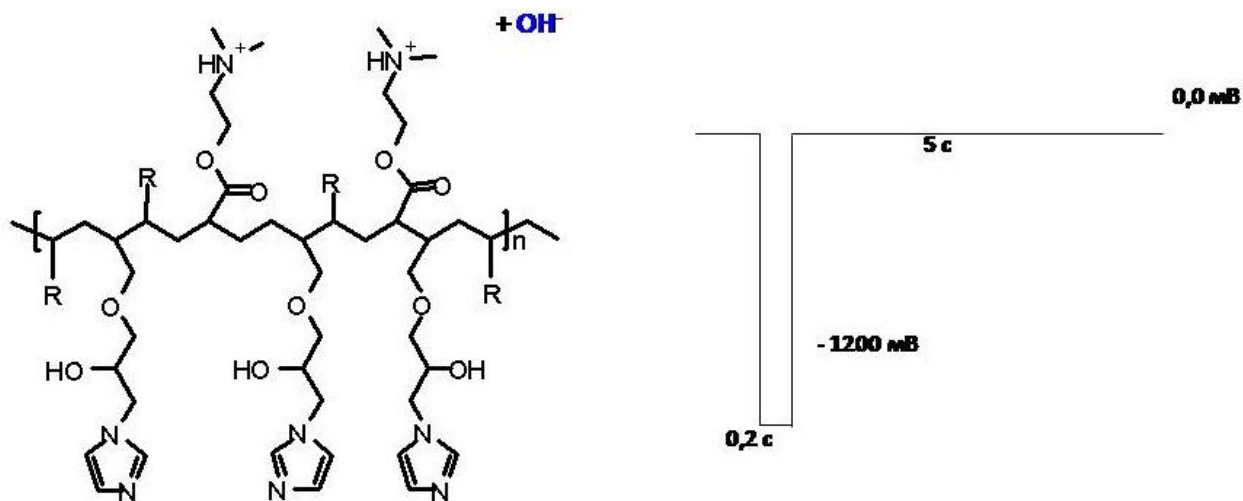


Рис. 3.43. Структура (зліва) та схема електроосадження (справа) катодного полімеру CP9.

При цьому на поверхні робочого електроду генеруються гідроксил-іони (ОН<sup>-</sup>) які, взаємодіючи із аміногрупами катодного полімеру, депротонують їх і переводять полімер у нерозчинну форму, захоплюючи молекули ферменту.

Кількість циклів електроосадження катодних полімерів не є сталою і підбирається експериментально для кожного типу біоселективного елементу. У випадку іммобілізації пермеабілізованих клітин *O. polymorpha* «tr1», оптимальна

кількість електроосаджень *CP9* є рівною десятьом циклам. Для порівняння ефективності іммобілізації клітин катодним полімером, було використано метод утримання клітин на поверхні робочого електроду за посередництва діалізної мембрани як контрольного підходу. В обох підходах іммобілізації клітин у ролі вільнодифундуючого медіатора використовували феназинметасульфат (ФМС). ФМС легко проникає всередину пермеабілізованих кліти і забезпечує перенесення електронів від ФЦ  $b_2$ , розташованого у мітохондріальній мембрані, до поверхні робочих електродів. Для окислення ФМС на поверхні 3,05 мм графітових стержневих електродів, прикладали робочий потенціал 0,0 мВ проти електроду порівняння Ag/AgCl [131].

Типові хроноамперометричні дослідження біоелектродів на основі пермеабілізованих клітин *O. polymorpha* «tr1» за різного типу їх іммобілізації на стержневому графітовому електроді представлено на Рис. 3.44.

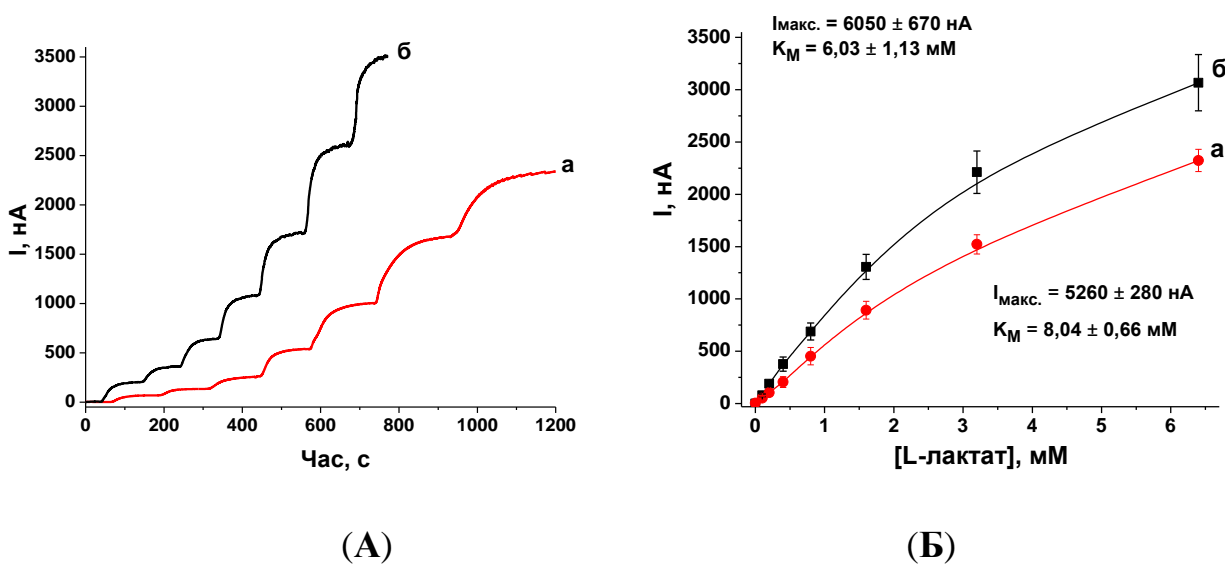


Рис. 3.44. (А) Хроноамперограми визначення L-лактату за допомогою мікробного сенсора на основі пермеабілізованих клітин рекомбінантного штаму *O. polymorpha* «tr1», фіксованих на електроді діалізною мембраною (а) та іммобілізованих методом електроосадження в присутності полімеру *CP9* (б). (Б) Калібрувальні криві для мікробного сенсора на основі клітин

рекомбінантного штаму *O. polymorpha* «tr1», фіксованих на електроді діалізною мембраною (а) та іммобілізованих методом електроосадження в присутності полімеру CP9 (б). Умови: графітовий стержневий електрод, 3,05 мм у діаметрі, робочий потенціал 0,0 мМ проти Ag/AgCl електроду порівняння, 0,2 мМ ФМС у 50 мМ ФБ, рН 7,8 при постійному перемішуванні і температурі 24 °С.

Ефективність різних способів іммобілізації пермеабілізованих дріжджових клітин, а саме: фізична фіксація діалізною мембраною та захоплення клітин в електроосаженому шарі полімеру CP9 суттєво відрізнялась. Так, відгук біоелектроду на основі методу електроосадження CP9 з одночасним захопленням пермеабілізованих клітин демонструє більш високе значення величини струму на внесений L-лактат (Рис. 3.44). Крім того, завдяки хорошій дифузії субстрату та медіатора до іммобілізованих в полімері клітин, біоелектроди демонструють швидший час відгуку у порівнянні із використанням діалізної мембрани. Швидкість відгуку біоелектродів на 0,1 мМ L-лактат складала приблизно 190 нА·хв<sup>-1</sup> для сенсорної системи з полімером CP9 та 60 нА·хв<sup>-1</sup> для системи на основі діалізної мембрани, відповідно.

Для оцінки ефективності використання клітин генетично сконструйованого штаму *O. polymorpha* «tr1» - надпродуцента ФЦ  $b_2$  з метою покращення біоаналітичних характеристик L-лактатного біосенсора, було використано пермеабілізовані клітини вихідного штаму *O. polymorpha* С-105 як контролю. Обидва типи клітин іммобілізували за посередництва діалізної мембрани (Рис. 3.45).

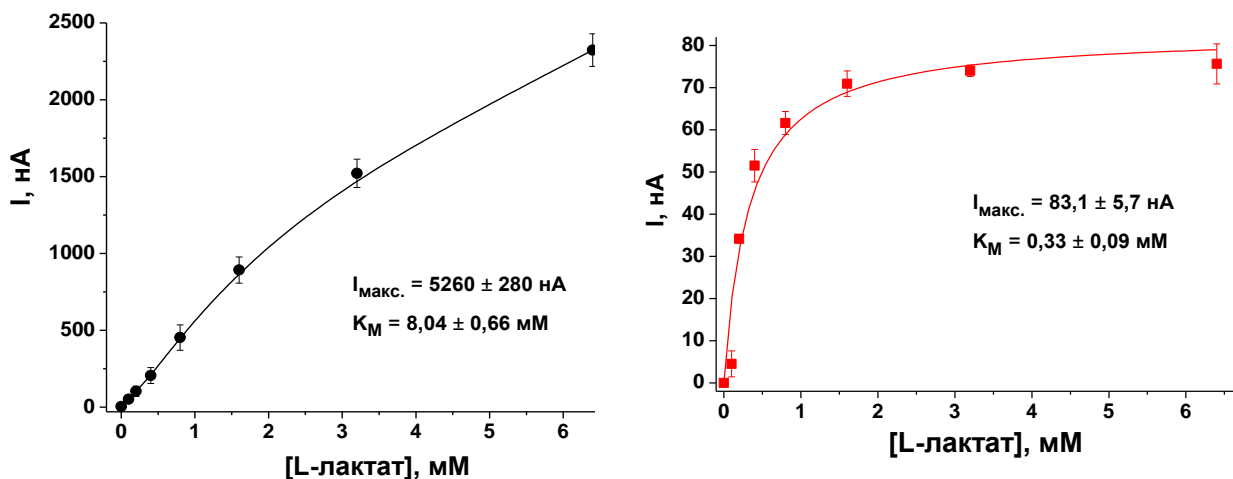


Рис. 3.45. Калібрувальні графіки на внесення зростаючих концентрацій L-лактату для біоелектродів на основі рекомбінантних клітин *O. polymorpha* «tr1» (зліва) та клітин вихідного штаму *O. polymorpha* C-105, іммобілізованих діалізною мембраною (справа).

Як чітко показано на Рис. 3.45, для біоелектродів на основі сконструйованих клітин надпродуцента ФЦ  $b_2$  *O. polymorpha* «tr1» спостерігається суттєво вища величина сигналу на внесення L-лактату в порівнянні з біоелектродами на основі клітин *O. polymorpha* C-105. Максимальний струм при насиченні субстрату ( $I_{\text{макс.}}$ ) біоелектродів на основі клітин *O. polymorpha* C-105 становив  $83,1 \pm 5,7$  нА, тоді як для електродів на основі клітин *O. polymorpha* «tr1» значення  $I_{\text{макс.}}$  відповідало  $5260 \pm 280$  нА за однакових умов. Ці результати вказують на те, що максимальний внесок на окислення L-лактату природного ФЦ  $b_2$  всередині клітин, який присутній в однаковій мірі як у клітинах *O. polymorpha* «tr1», так і клітинах C-105, не перевищує 80 нА. Це значення становить лише близько 1,5 % від  $I_{\text{макс.}}$  електродів на основі клітин *O. polymorpha* «tr1» (5200 нА). Отже, високий відгук забезпечується, головним чином, саме за рахунок рекомбінантного ФЦ  $b_2$ , а не вихідним ферментом, присутнім у батьківському штамі.

Біоелектроди на основі рекомбінантних клітин *O. polymorpha* «tr1» демонструють у 20-25 разів вище значення позірної константи Міхаеліс-Ментен ( $K_M$ ) у порівнянні з електродами на основі клітин *O. polymorpha* C-105 (8,0 - 0,66 мМ проти  $0,3 \pm 0,09$  мМ для L-лактату). Збільшення значення  $K_M$  позитивно впливає на властивості біосенсора завдяки збільшенню лінійного діапазону визначення - аж до 1,6 мМ L-лактату. Широкий лінійний діапазон визначення сенсора краще пристосований до типового діапазону концентрації L-лактату в реальних зразках, що дозволяє уникнути етапу розведення зразків. Водночас, із розширенням діапазону лінійності зберігається низька межа виявлення L-лактату біоелектродами (близько 6 мкМ), що забезпечує вищу чутливість його визначення. Оптимальне значення рН для розробленого L-лактатного біосенсора на основі рекомбінантних клітин знаходиться в діапазоні 7,5-8,2 з оптимальною температурою від 36 до 42 °С.

Для використання L-лактат-селективного мікробного біосенсора для аналізу реальних зразків, важливим є відсутність відгуку на супутні речовини, наприклад, D-лактат, піруват, сукцинат, L-малат, цитрат,  $\alpha$ -кетоглутарат, урат, D-глюкоза та етанол (Рис. 3.46).

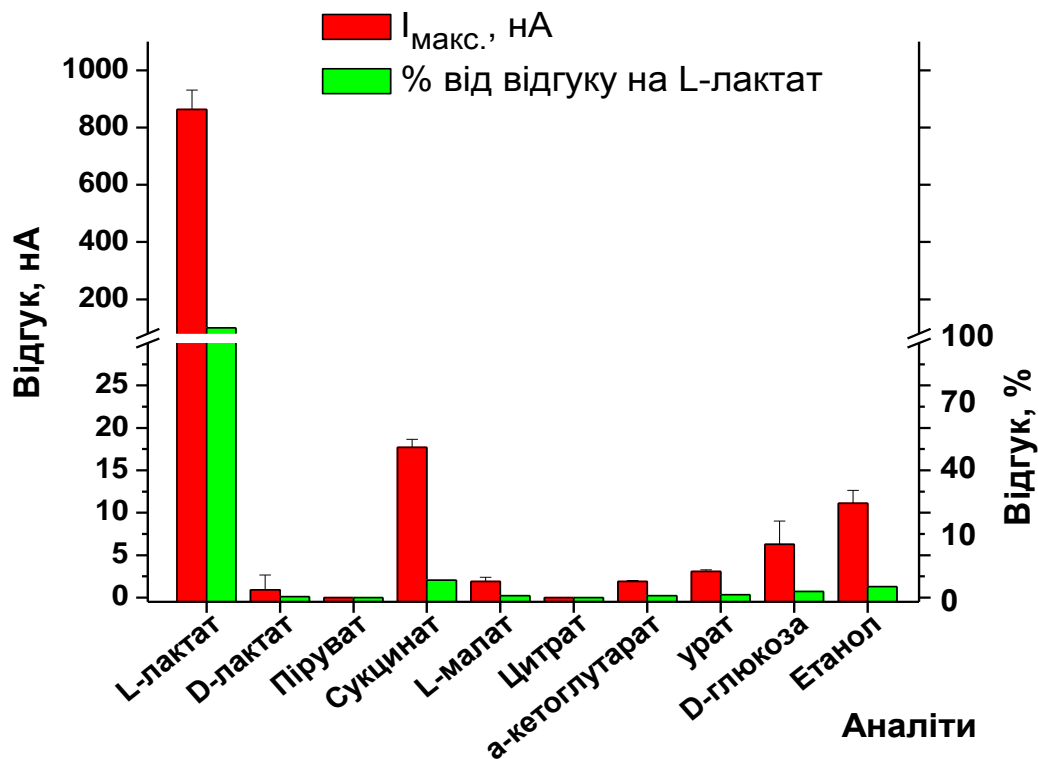


Рис. 3.46. Тест на специфічність L-лактатного біосенсора на основі клітин *O. polymorpha* «tr1», іммобілізованих за посередництва полімеру CP9. Відгук біоелектроду (в нА та % відносно відгуку на L-лактат) на 1 мМ аналіт: L-лактат - 863 нА, 100 %; D-лактат - 0,92 нА, 0,1 %; піруват - 0,0 нА, 0 %; сукцинат - 17,7 нА, 2 %; L-малат - 1,88 нА, 0,22 %;  $\alpha$ -кетоглутарат - 1,9 нА, 0,22 %; урат - 3,07 нА, 0,66 %; цитрат - 0,0 нА, 0 %; D-глюкоза - 6,29 нА, 0,73 % та етанол - 11,1 нА, 1,29 %.

Створений мікробний L-лактат-селективний біосенсор демонструє незначну перехресну чутливість до деяких досліджених сполук, проте, за винятком сукцинату, D-глюкози та етанолу, відносний відгук становив менше 1 %. Таким чином, відгук на L-лактат створеного клітинного сенсора є достатньо специфічним.

Для мікробних біоелектродів із різним типом утримання пермеабалізованих клітин було досліджено їх операційну стабільність та стабільність при зберіганні. Аналіз стабільності при зберіганні проводили при кімнатній температурі 24 °С з використанням 1 мМ розчину L-лактату (як аналіту) в 50 мМ фосфатному ФБ, рН 7,8. При дослідженні операційної стабільності біоелектродів використовували 3 мМ розчин L-лактату. Операційну стабільність оцінювали за допомогою автоматичної ін'єкційної аналізаторної системи [218, 219]. Біоелектроди інтегрували в протічну електрохімічну комірку, через яку автоматично подавалось 15 введень 500 мкл стандартного розчину 1 мМ L-лактату за годину. На рисунку 3.47 показано пікові струми L-лактат-селективних біоелектродів з різним типом утримання пермеабалізованих клітин *O. polymorpha* «tr1» при безперервному введенні калібратора протягом 24 годин (що відповідало 360 окремим вимірюванням).

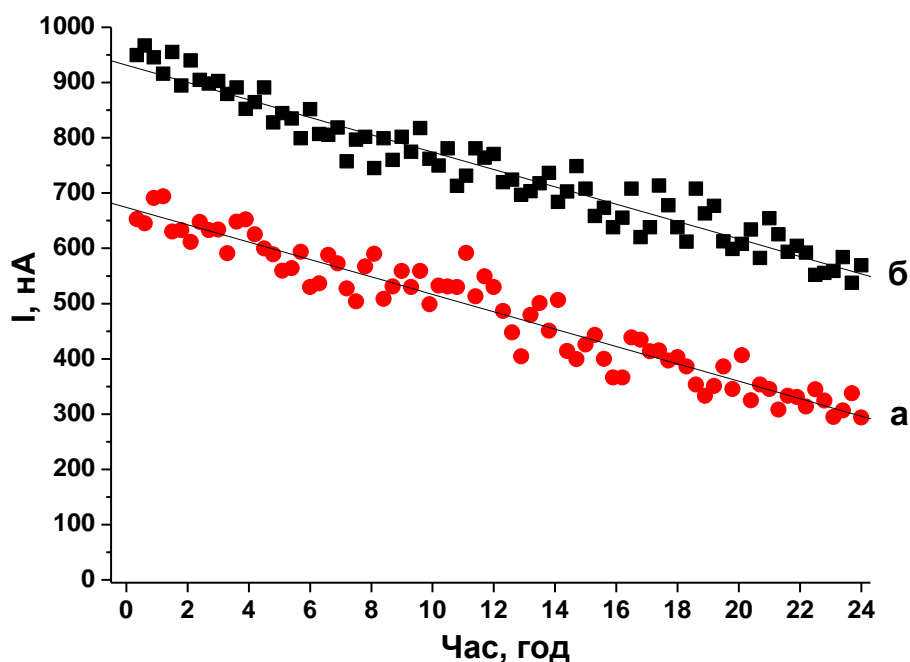


Рис. 3.47. Операційна стабільність L-лактат-селективних біосенсорів на основі пермеабалізованих клітин *O. polymorpha* «tr1», інтегрованих в



автоматичний ін'єкційний аналізатор. (а) дріжджові клітини, іммобілізовані діалізною мембраною; (б) клітини, захоплені шаром електроосаджуваного катодного полімеру. Умови: швидкість потоку  $5 \text{ мл} \cdot \text{хв}^{-1}$ , введення проби кожні 4 хв, робочий потенціал  $0,0 \text{ мМ}$  проти  $\text{Ag}/\text{AgCl}$  електроду порівняння,  $0,2 \text{ мМ}$  ФМС у  $50 \text{ мМ}$  ФБ, рН 7,8. Наведено дані для типового експерименту.

Обидва типи біоелектродів показали лінійне зниження величини відгуку протягом 24 годин безперервної роботи, що відповідало 360 незалежним вимірюванням  $1 \text{ мМ}$  L-лактату. В іншому експерименті, пікові струми біоелектродів спадали до 50 % від вихідного рівня сигналу після приблизно 26-30 годин безперервної роботи сенсорної системи. Незважаючи на деяке зниження величини відгуку біоелектродів, розроблені біосенсори демонструють задовільну операційну стабільність для визначення L-лактату в модельних зразках, особливо, якщо вони інтегровані в сенсорний ін'єкційний аналізатор, що дозволяє їх повторно recalібрувати.

Результати дослідження стабільності при зберіганні біоелектродів із різним типом утримання пермеабілізованих рекомбінантних клітин наведено у таблиці 3.14.

Табл. 3.14.

Стабільність при зберіганні мікробних біоелектродів із різним типом утримання пермеабілізованих рекомбінантних клітин. Наведено дані для типового експерименту

Відгук у %, відносно вихідного значення	Час зберігання, доби									
	0	2	4	6	8	10	12	14	24	40
Утримання діалізною мембраною	100	109	103	98,6	93,8	90,7	86,2	83	76,8	----
Захоплення шаром катодного полімеру	100	99,8	98,3	98,8	97	94,4	90,5	89,3	80,1	67,2

Для біоелектродів з обома типами утримання пермеабілізованих клітин стабільність при зберіганні була вищою ніж 24 доби (Табл. 3.14). На другий день зберігання в буферному розчині відгук біоелектродів на основі діалізної мембрани підвищився на 10 % відносно вихідного рівня сигналу, виміряного у перший день визначення. Цей ефект часто спостерігається для амперометричних біосенсорів і пояснюється зрівноваженням сенсорної архітектури та, особливо, набряканням діалізної мембрани, що полегшує дифузійний доступ субстрату та медіатора до іммобілізованих клітин. Після приблизно 24 днів зберігання біоелектроди на основі діалізної мембрани виходили з ладу через ушкодження мембрани. Біоелектроди на основі захоплених *CP9* пермеабілізованих клітин *O. polymorpha* «tr1» можуть використовуватися протягом більше 40 днів при зберіганні у буфері при 4 °С.

Значно покращену стабільність L-лактат-селективних мікробних біосенсорів у порівнянні з аналогічним ензимним біосенсором на основі очищеного ферменту [217] можна пояснити збереженням нативної структури ФЦ  $b_2$  у природному оточенні – мембранах дріжджових мітохондрій.

### 3.6.1.2. Конструювання безмедіаторного мікробного біосенсора для аналізу L-лактату на основі клітин *O. polymorpha* «tr1»

При конструюванні безмедіаторного мікробного біосенсора на основі клітин *O. polymorpha* «tr1» нами використано принцип електрохімічного виявлення L-лактату, в основі якого лежить конкуренція за споживання кисню між робочим електродом і апаратом дихання дріжджових клітин.

На початкових етапах дослідження проведено оптимізацію сенсорної системи, зокрема, здійснено селекцію матеріалу робочого електроду (золото, платина і графіт) та оптимізовано робочий потенціал для ефективного електрохімічного відновлення кисню на електроді. Залежність величини сенсорного сигналу різних варіантів біоелектродів від прикладеного робочого потенціалу аналізували за присутності та відсутності L-лактату (Рис. 3.48).

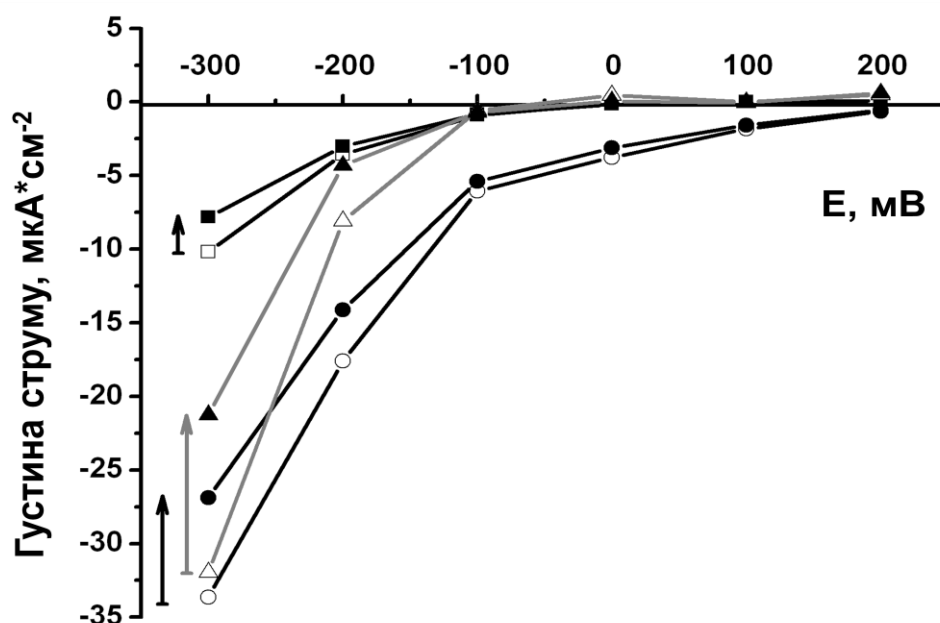


Рис. 3.48. Гідродинамічні вольтамперограми залежності відгуку біоелектродів на основі різних типів електродних матеріалів (золото - квадрат, платина - круг і графіт - трикутники), модифікованих рекомбінантними клітинами дріжджів *O. polymorpha* «tr1», за відсутності (порожні символи) і в присутності (затушовані символи) 1 мм L-лактату.

Із досліджених електродних матеріалів платиновий електрод демонструє високий сенсорний сигнал для відновлення кисню при  $-100$  мВ проти Ag/AgCl електроду порівняння, що розглядається як недолік через генерацію високого фонового шуму сенсором. З іншого боку, як графітові, так і золоті електроди дають низькі сенсорні сигнали для кисню при  $-100$  мВ проти Ag/AgCl, що знижує можливий внесок перешкод в загальний струм відновлення. Незважаючи на незначний фоновий струм, золотий електрод виявляв мінімальні зміни величини відгуку біосенсора на внесення L-лактату, що свідчить про слабку його чутливість. Біоелектроди на основі графіту демонстрували найвищу різницю між сенсорним сигналом на L-лактат і фоновим струмом, що свідчить про високу чутливість для даного типу мікробного біосенсора. Окрім того, найбільший приріст сенсорного сигналу для цього типу біоелектроду після додавання L-лактату припадає на робочий потенціал  $-300$  мВ проти Ag/AgCl електроду порівняння, який було вибрано для подальших амперометричних досліджень.

Для перевірки гіпотези, що конкуренція за кисень між клітинами та платиновим електродом безпосередньо залежить від вмісту ФЦ  $b_2$  в клітинах, проведено порівняння величини сенсорного сигналу для двох типів мікробних електродів: на основі рекомбінантних клітин *O. polymorpha* «tr1» (з питомою активністю ФЦ  $b_2$   $3,2$  Од·мг<sup>-1</sup> білку) та клітин дикого штаму дріжджів *O. polymorpha* 356 (з питомою активністю ФЦ  $b_2$   $0,5$  Од·мг<sup>-1</sup> білку) (Рис. 3.49).

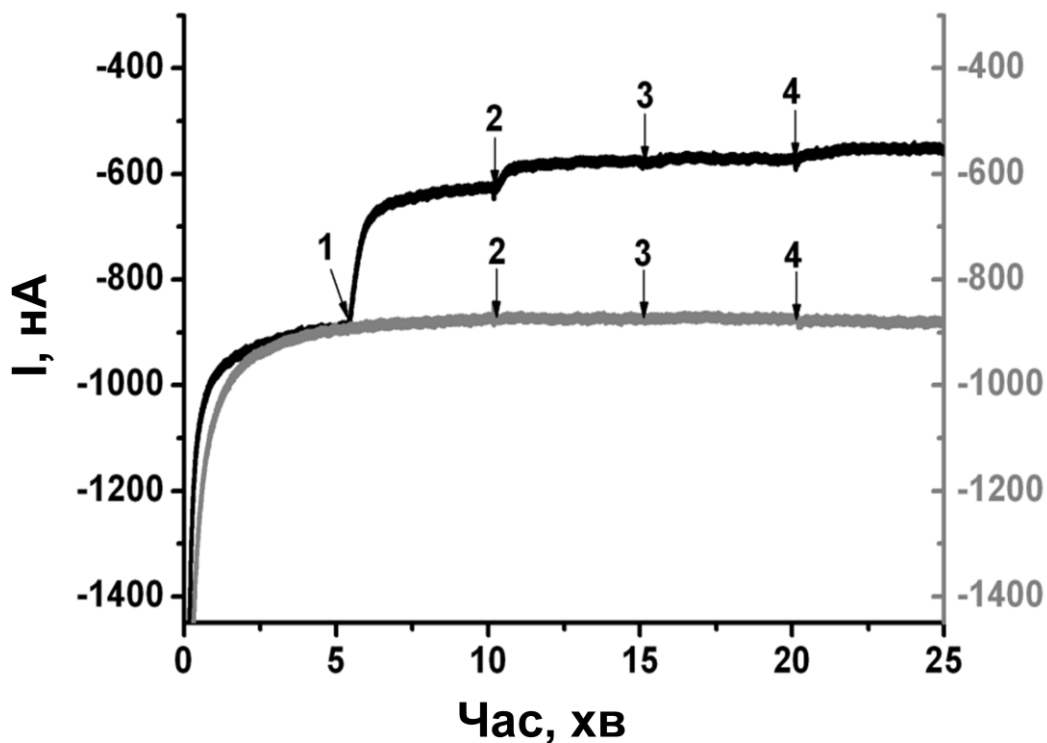


Рис. 3.49. Хроноамперометрична відповідь мікробних електродів на основі «диких» (сіра лінія) та рекомбінантних клітин *O. polymorpha* (чорна лінія) на послідовні внесення (1; 2,5; 5; 10 мМ) L-лактату. Умови: робочий електрод – графіт площею 7,07 мм, робочий потенціал -300 мВ проти Ag/AgCl електроду порівняння.

Як видно із Рис. 3.49, внесення зростаючих концентрацій L-лактату не викликає жодної зміни відгуку на кисень для біоелектроду на основі дріжджових клітин дикого типу із низьким вмістом ФЦ  $b_2$ . Натомість, біоелектрод на основі рекомбінантних клітин *O. polymorpha* «tr1», що надекспресують ФЦ  $b_2$ , демонструє різке зниження сили струму при відновленні кисню, яке пропорційне концентрації внесеного L-лактату (Рис. 3.49). Ця закономірність підтверджує залежність величини відгуку біоелектродів від вмісту ФЦ  $b_2$  всередині клітин.

Надекспресія ФЦ  $b_2$  у рекомбінантних клітинах дріжджів забезпечує не лише значне підвищення чутливості біоелектроду до L-лактату ( $35,4 \text{ А} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{м}^{-2}$ ),

але також підвищує і його селективність, що зумовлено специфічністю споживання кисню пермеабілізованими клітинами через L-лактатне дихання, тоді як додавання будь-яких інших речовин (наприклад, глюкози та ін.) не дає жодного підвищення фонового струму. Таким чином, завдяки генно-інженерній модифікації дріжджів відбувається шестикратне збільшення синтезу цільового фермента, порівняно із дикими штамми, що приводить до підвищення чутливості і селективності відгуку клітин на L-лактат.

У клітинах дріжджів ФЦ  $b_2$  знаходиться в міжмембранному просторі мітохондрій і відповідає за окислення L-лактату до пірувату та є важливим компонентом L-лактат-залежного дихання клітин. Під час процесу дихання L-лактат окислюється ФЦ  $b_2$  до пірувату з перенесенням двох електронів на цитохром  $c$  і, таким чином, ці електрони далі подаються до комплексу IV, де відбувається процес відновлення кисню до води. Підсумовуючи, два електрони, одержані внаслідок окислення L-лактату, в кінцевому рахунку, використовуються для відновлення кисню в комплексі IV дихального ланцюга мітохондрій і є основою запропонованого безмедіаторного біосенсорного підходу. Для того, щоб продемонструвати достовірність цього біоаналітичного принципу, проведено контрольний експеримент, що включав порівняння сенсорного сигналу біоелектрода на основі рекомбінантних клітин *O. polymorpha* «tr1» без обробки інгібітором комплексу IV - ціанідом калію (KCN) та сенсорного сигналу того ж біоелектроду після використання KCN (Рис. 3.50).

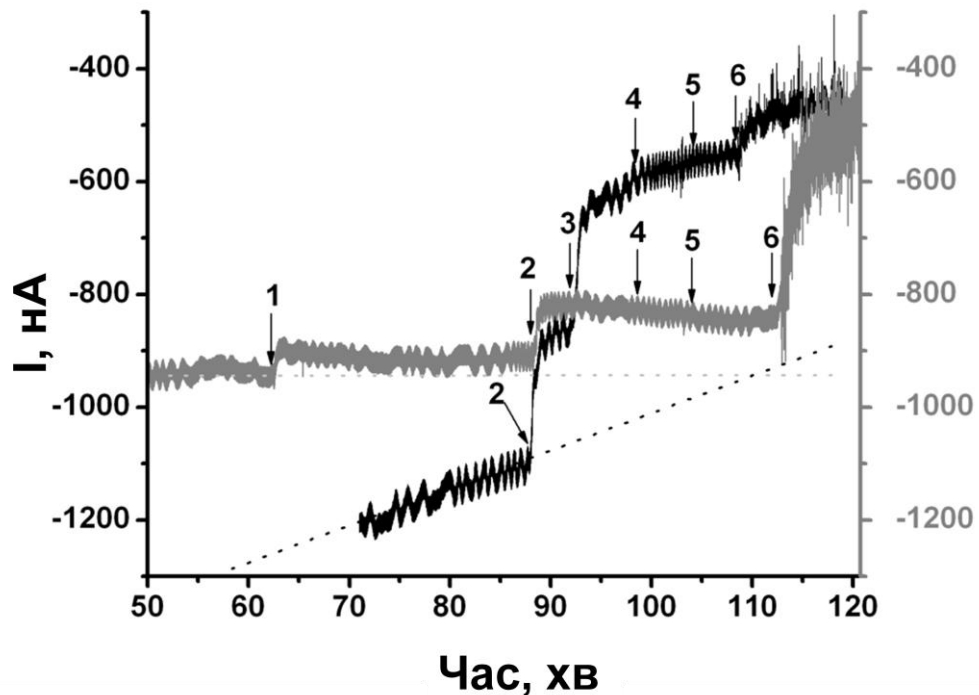


Рис. 3.50. Електрохімічне дослідження участі комплексу IV при аналізі L-лактату безмедіаторним мікробним біосенсором на основі рекомбінантних клітин *O. polymorpha* «tr1». Хроноамперометрична відповідь на внесення L-лактату біоелектроду на основі клітин без KCN (чорна лінія) та того ж біоелектроду після обробки інгібітором дихання (сіра лінія). Позначення: (1) - внесення 3 мМ KCN; (2-5) – внесення 1; 2,5; 5; 10 мМ L-лактату, відповідно; (6) - продування комірки аргоном для усунення кисню.

Як свідчить Рис. 3.50, порівняння електрохімічних характеристик біоелектродів на основі інгібованих та неінгібованих клітин дріжджів дає можливість зробити висновок про обґрунтованість нашого пояснення шляху перенесення електронів і послідовне залучення ферментативного каскаду, що включає: ФЦ  $b_2$ , цитохром  $c$  і комплекс IV дихального ланцюга мітохондрій. Початковий фоновий струм, за відсутності L-лактату, пропорційний концентрації кисню біля поверхні електроду. Як тільки L-лактат поступово додається до електрохімічної комірки, клітини починають інтенсивніше споживати кисень за

рахунок активного L-лактатного дихання, і, таким чином, спостерігається супутнє зменшення фонового струму відновлення кисню на електроді (Рис 3.50, чорна лінія). З іншого боку, інгібування комплексу IV мітохондріального дихального ланцюга ціанідом запобігає споживанню кисню комплексом IV. Відновлення кисню на графітовому електроді підтверджується продувкою аргону в електроліті, внаслідок чого, кисень повністю видаляється з сенсорної системи, що призводить до падіння фонового струму до однакового рівня в обох випадках - для неінгібованого та заінгібованого мікробного біоелектроду (Рис. 3.50).

Загальний механізм перенесення електронів при клітинноу відновленні кисню, викликаного окисненням L-лактату за посередництва ФЦ  $b_2$ , зміна концентрації кисню на електроді в залежності від інтенсивності дихання клітин, а також вплив інгібування комплексу IV дихального ланцюга мітохондрій на величину відгуку мікробних біоелектродів схематично представлено на Рис. 3.51.



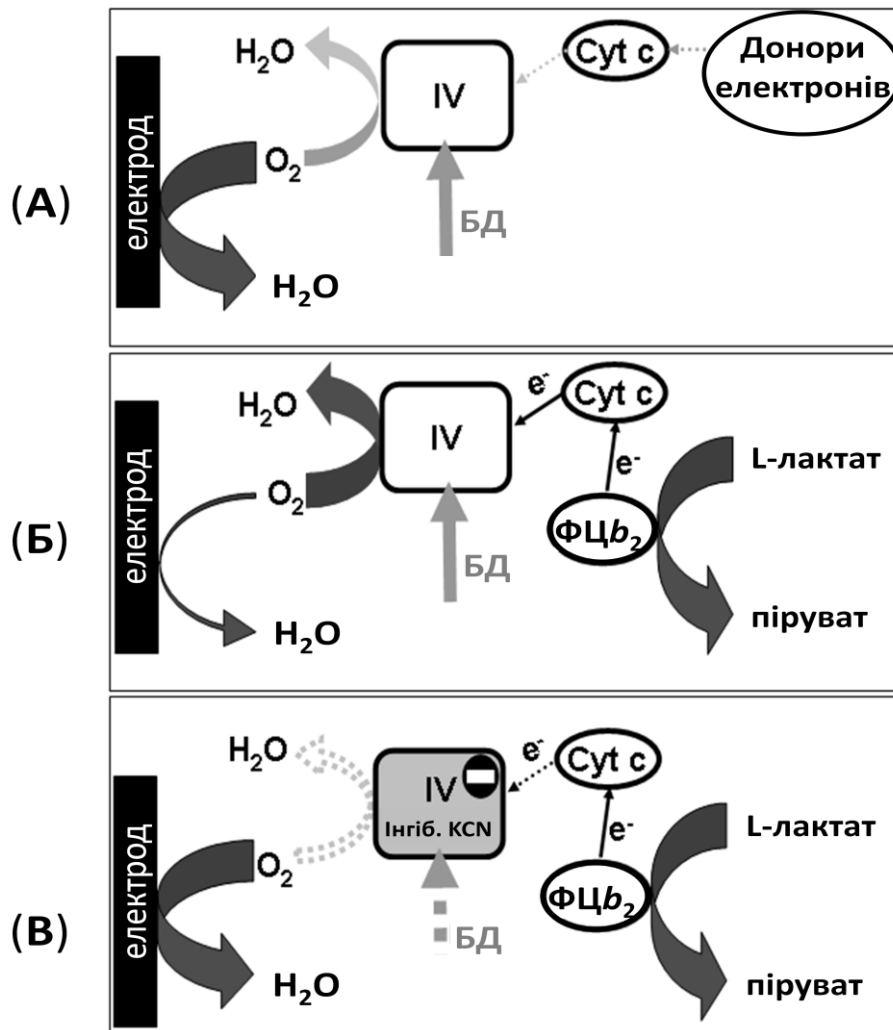


Рис. 3.51. Схематичне зображення ензиматично-електрохімічних процесів у біоелементі безмедіаторного мікробного сенсора на L-лактат: (А) конкуренція за споживання кисню між поверхнею робочого електроду і процесом базового дихання (БД) в дріжджових клітин; (Б) дефіцит кисню для ефективного його відновлення на електроді внаслідок посиленого L-лактат-залежного дихання рекомбінантних дріжджових клітин - надпродуцентів ФЦ  $b_2$ ; (В) блокування споживання кисню клітинами дріжджів внаслідок інгібування комплексу IV дихального ланцюга мітохондрій.

На Рис. 3.51 схематично представлено протікання ензиматично-електрохімічних процесів у біоелементі мікробного біосенсора на L-лактат:

(А) демонструє природу струму відновлення кисню на електроді (початковий фоновий струм), зареєстрованого за відсутності L-лактату; (Б) ілюструє конкуренцію за споживання кисню між робочим електродом і інтенсивним L-лактатним диханням клітин, що призводить до зниження доступного для відновлення на електроді кисню; (В) зображує роль інгібування комплексу IV на блокування L-лактат-залежної відповіді мікробних біоелектродів.

Розроблений безмедіаторний мікробний біосенсор може бути використано не лише для кількісного аналізу L-лактату, а й при дослідженні впливу надекспресії ключових компонентів дихального ланцюга на метаболізм субстратів дихання у рекомбінантних дріжджових клітинах [220].

### **3.6.1.3. Конструювання та оптимізація мікробних біосенсорів на D-лактат на основі клітинних уламків *O. polymorpha* «tr6» і електроосаджуваних полімерів**

У даній роботі проведено дослідження по конструюванню D-лактат-селективного біосенсора на основі клітинних уламків *O. polymorpha* «tr6». Преревагами 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 (DIDH) (КФ 1.1.2.4) - це мембрано-з'язаний фермент, його концентрація в уламках рекомбінантних клітин є вищою у порівнянні з цитозольною фракцією. 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» та осмійвмісного катодного полімера *CP-Os*.

Електроосаджуваний осмій-ди(біпіридил)хлор-вмісний *CP-Os* був синтезований в лабораторії електроаналітики та біосенсорики Рурського університету (м. Бохум, ФРН). Для осадження катодного полімеру застосовували наступну схему катодного електроосадження: -1200 мВ – 0,2 с та 0 мВ - 5 с (Рис. 3.52) [167]. При цьому на поверхні робочого електроду генеруються гідроксил-іони (ОН<sup>-</sup>) які, взаємодіючи із аміногрупами катодного полімеру, депротонують їх і переводять полімер у нерозчинну форму. Кількість циклів електроосадження підбиралась експериментально.

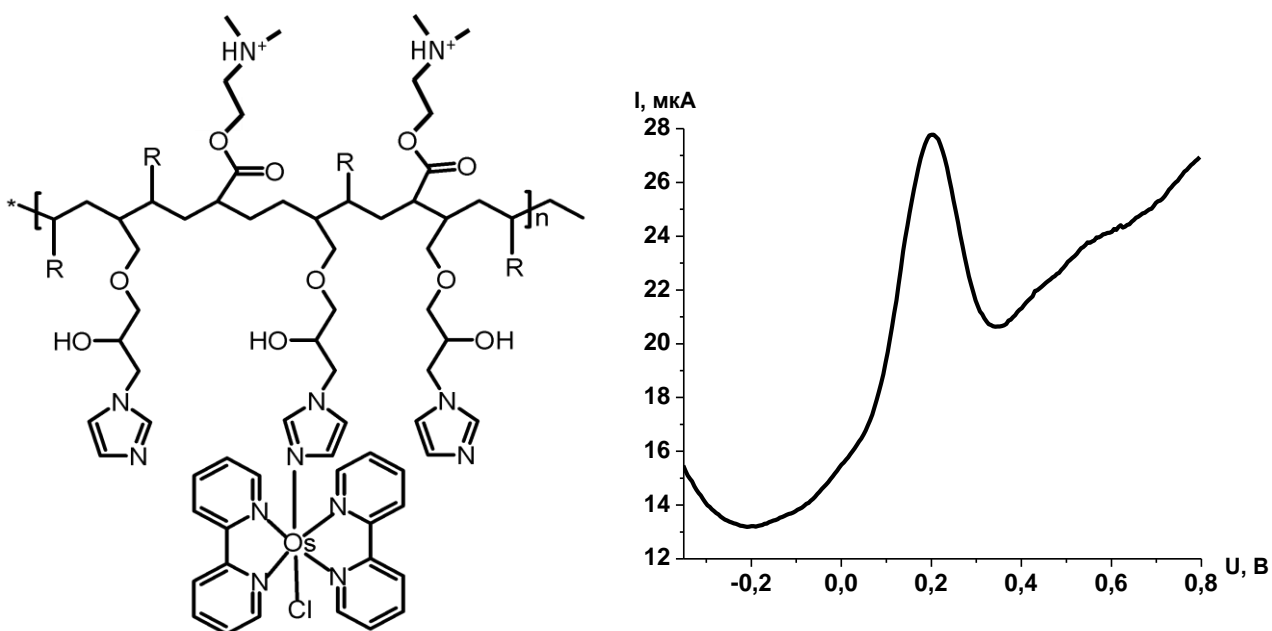


Рис. 3.52. Структура катодного полімеру *CP-Os*, модифікованого [Os(bpy)<sub>2</sub>Cl]-комплексом (зліва). Диференційна пульс-вольтаммограма (ДПВ) електроосадженого *CP9-Os* (справа). Умови проведення ДПВ: швидкість сканування 25 мВ/с, модуляційна амплітуда 49,5 мВ проти Ag/AgCl електроду порівняння [221].

*CP-Os* поєднує дві функції: діє як медіатор перенесення електронів та як носій компонентів біоселективного елемента на поверхні робочого електроду.

Принципова схема переносу електронів в архітектурі D-лактат-селективного сенсора представлена на Рис. 3.53.

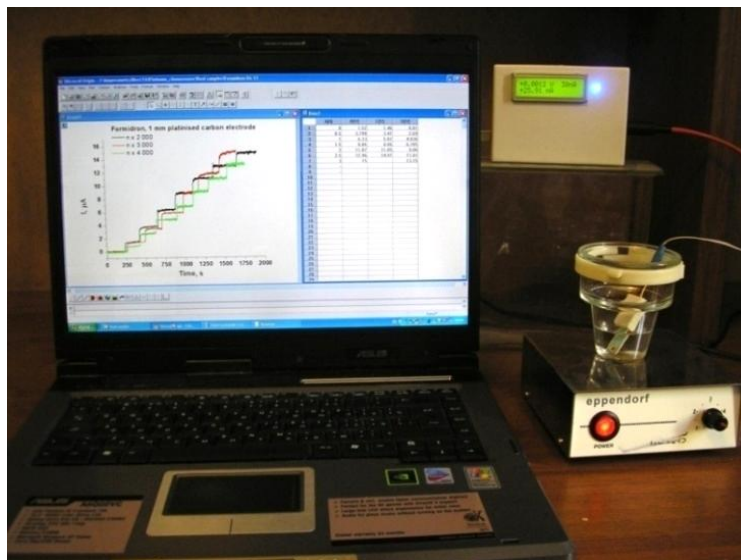
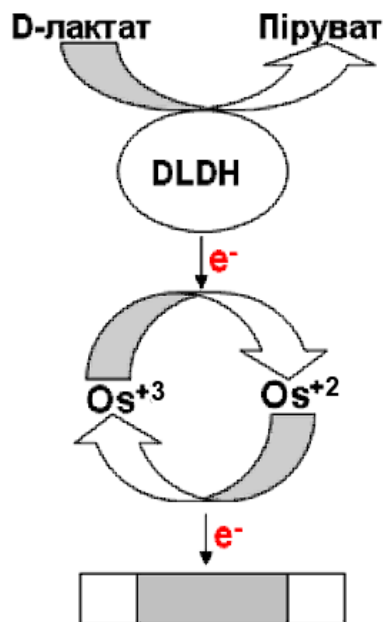


Рис. 3.53. Схема D-лактат-селективного амперометричного біосенсора на основі уламків клітин та Os-вмісного полімера. Позначення: DLDH – D-лактат: цитохром *c* - оксидоредуктаза.

Для оцінки ефективності електронного переносу між компонентами біоселективного елемента та відсутності негативного впливу процесу електроосадження та токсичності  $Os^{2+}/Os^{3+}$  на ферменти, було проведено цикловольтамперометричні дослідження сенсора (Рис. 3.54).

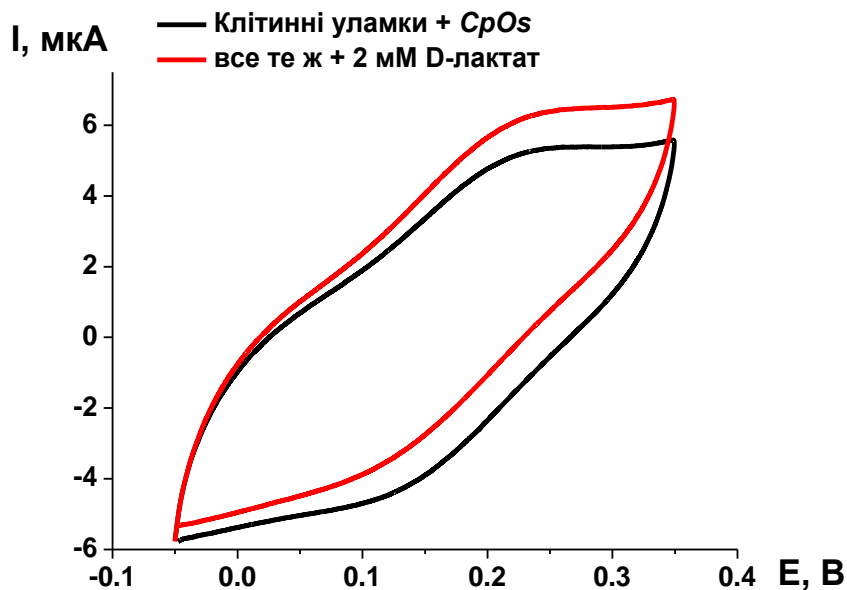


Рис. 3.54. Циклічні вольтамперограми для 3,05 мм графітового електроду, модифікованого електроосадженими клітинними уламками дріжджів у присутності полімеру *CP-Os* без внесення аналіту (чорний колір) та з додаванням 2 мМ D-лактату (червоне забарвлення). Умови: швидкість сканування  $6 \text{ мВ} \cdot \text{с}^{-1}$  проти  $\text{Ag}/\text{AgCl}$  у 50 мМ фосфатному буфері, рН 7,8.

Як видно із Рис. 3.54, біоелемент селективної мембрани зберігає свою каталітичну активність при внесенні відповідного субстрату, а, отже, використання електроосаджуваного Os-вмісного *CP* не інактивує DLDH.

Для визначення оптимального робочого потенціалу при використанні системи «уламки клітин-*CP-Os*», було проведено хроноамперометричні дослідження біоелектродів при різних робочих потенціалах: +50, +150 та +250 мВ проти  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ , відповідно (Рис. 3.55).

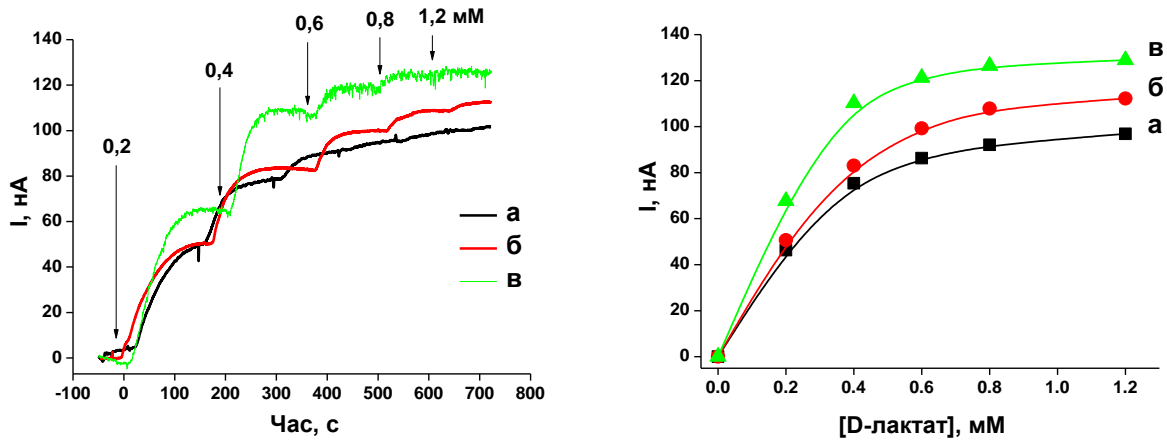


Рис. 3.55. Хроноамперометрична відповідь (зліва) та калібрувальна крива відгуку 4 мм золотих планарних електродів «Dropsens» C220, модифікованих уламками клітин, на зростаючі концентрації D-лактату (справа) при різних робочих потенціалах: 50 мВ (а); 150 мВ (б); 250 мВ (в) проти Ag/AgCl у 50 мМ РБ, рН 7,8. Наведено дані для типового експерименту.

Як впливає із Рис. 3.55, робочий потенціал окислення осмієвого комплексу (+250 мВ проти Ag/AgCl) є найефективнішим для забезпечення оптимального переносу електронів у запропонованій архітектурі біоелемента. Це підтверджується найвищою величиною відгуку сенсора на внесений аналіт – удвічі в порівнянні із 50 мВ та у півтора раза - за потенціалу 150 мВ (Рис. 3.55). Саме тому потенціал 250 мВ проти Ag/AgCl використано нами як робочий в подальших дослідженнях.

Для забезпечення кращих операційних параметрів D-лактат-селективних біосенсорів на основі клітинних уламків надпродуцента DLDH - *O. polymorpha* «trb», нами запропоновано внесення в біоселективний шар сенсора екзогенного цитохрому *c*. У нативному оточенні всередині дріжджових клітин DLDH каталізує окислення D-лактату до пірувату з одночасним перенесенням електрону на цитохром *c* - природний акцептор електронів від DLDH. Завдяки цьому,

додаткова інтеграція екзогенного цитохрому *c* в сенсорну архітектуру може поліпшити операційні параметри біоелектродів. Конструкція біоелектродів із біензимною архітектурою включає одночасну ко-імобілізацію клітинних уламків та цитохрому *c* на робочій поверхні електроду. Як і у попередніх дослідженнях, для цього використовували електроосаджуваний осмій-вмісний катодний полімер *CP9-Os*, що поєднує у собі дві функції: перенесення електронів та утримання біоелементів на поверхні електродів. Принципова схема перенесення електронів у біензимній архітектурі D-лактат-селективного біосенсора представлено на Рис. 3.56, (А).

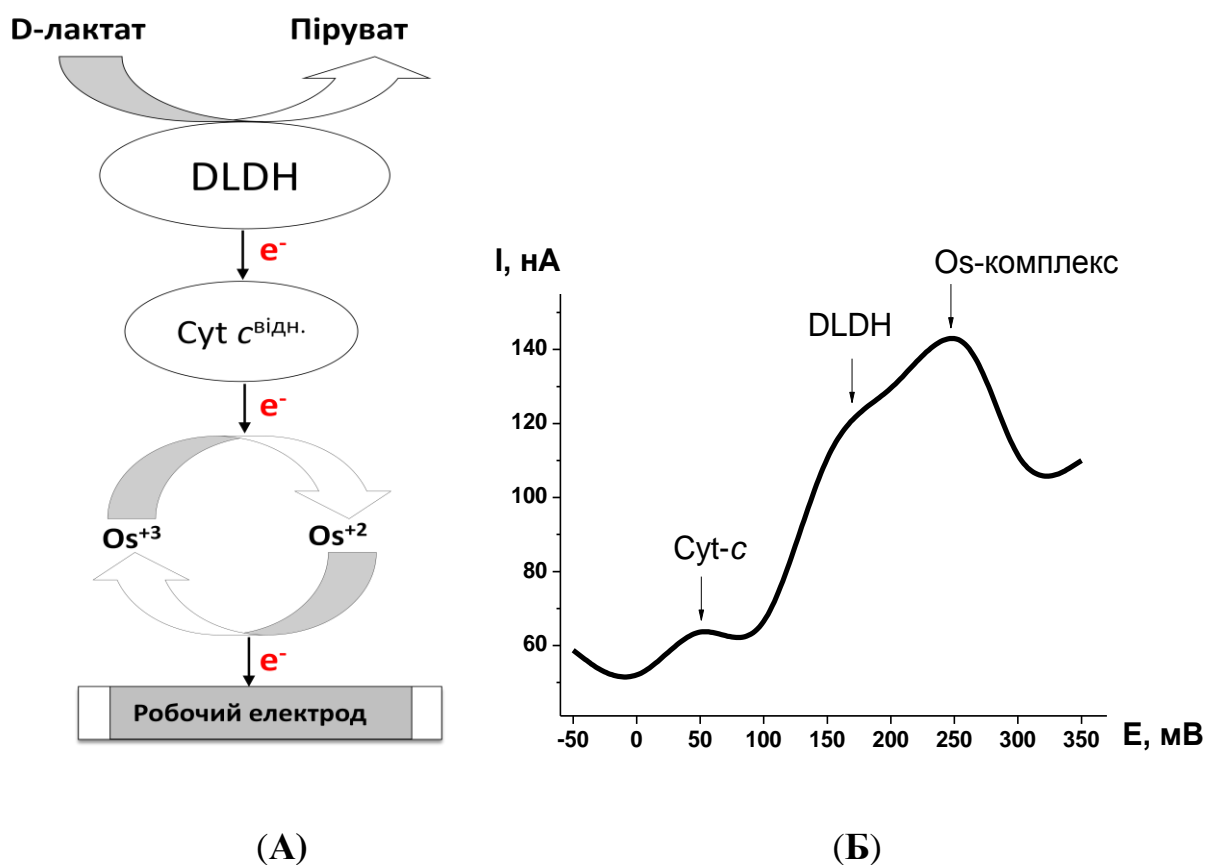


Рис. 3.56. Принципова схема (А) та диференціальна імпульсна вольтамперограма біензимного D-лактат-селективного біосенсора (Б). Позначення: DLDH – D-лактат: цитохром *c* - оксидоредуктаза, Cyt *c* – цитохром *c*.

Для оцінки оптимального робочого потенціалу біензимної сенсорної архітектури з використанням *CP9-Os*, було використано диференціальну імпульсну вольтамперометрію (Рис. 3.56, Б). Диференціальна імпульсна вольтамперограма біензимної сенсорної архітектури з використанням *CP9-Os* виявляє три піки, характерні різним електроактивним компонентам системи. Пік при 50 мВ відповідає прямому переносу електрона з відновленого цитохрому *c* на поверхню графітового електроду. Незначний пік при 150 мВ може бути результатом прямого перенесення електронів з DLDH на поверхню електродів. З іншого боку, найвищий пік при 250 мВ відповідає окисненню осмієвого комплексу *CP9-Os*. Останній потенціал виглядає оптимальним для ефективного перенесення електронів даної біензимної сенсорної архітектури. Для додаткового тестування вибраного потенціалу як робочого та відсутності інактивуєчого впливу осмієвого комплексу чи процесу електроосадження полімеру, проведено дослідження даного біензимного біоелектроду із *CP9-Os* за допомогою циклічної вольтамперометрії (Рис. 3.57).



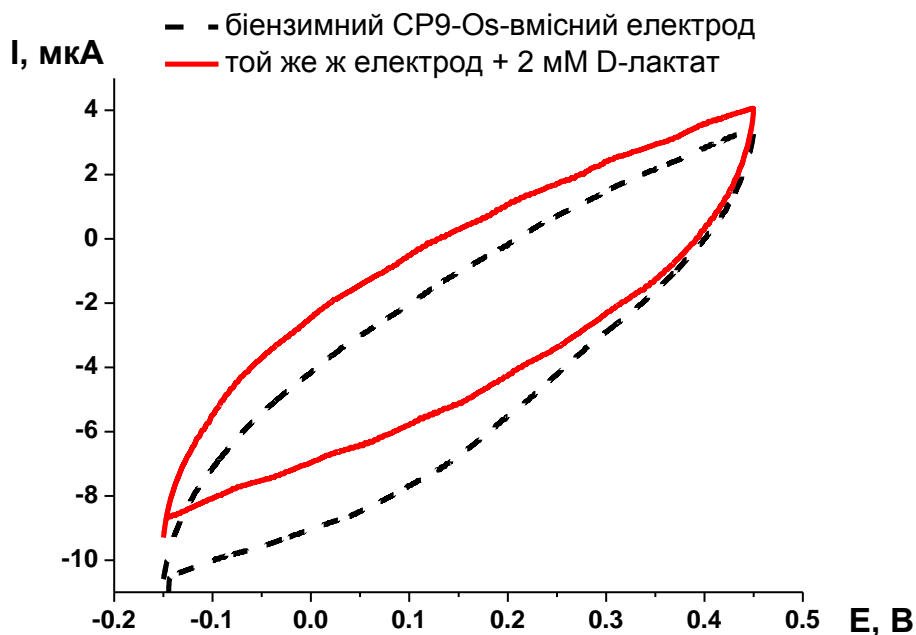


Рис. 3.57. Циклічні вольтамперограми біензимного біоелектроду на основі CP9-Os і графітового електроду без внесення аналіту (штрих-пунктирна лінія) та в присутності 2 мМ D-лактату (суцільна лінія). Умови: швидкість сканування  $6 \text{ мВ} \cdot \text{с}^{-1}$  проти Ag/AgCl у 50 мМ фосфатному буфері, pH 7,8.

Циклічні вольтамперограми чітко демонструють підвищення піку окислення графітового електроду на внесений D-лактат у діапазоні -100 – +400 мВ, що підтверджує відсутність інактивуючого впливу CP9-Os на біокомпоненти системи та вдало підібраний робочий потенціал (250 мВ). У зв'язку з цим, подальші експерименти проводили при робочому потенціалі 250 мВ проти Ag/AgCl електроду порівняння.

Аналіз хроноамперометричних та калібрувальних кривих, отриманих для біоелектродів із біензимною архітектурою, а також без внесення екзогенного цитохрому *c* представлено на Рис. 3.58.

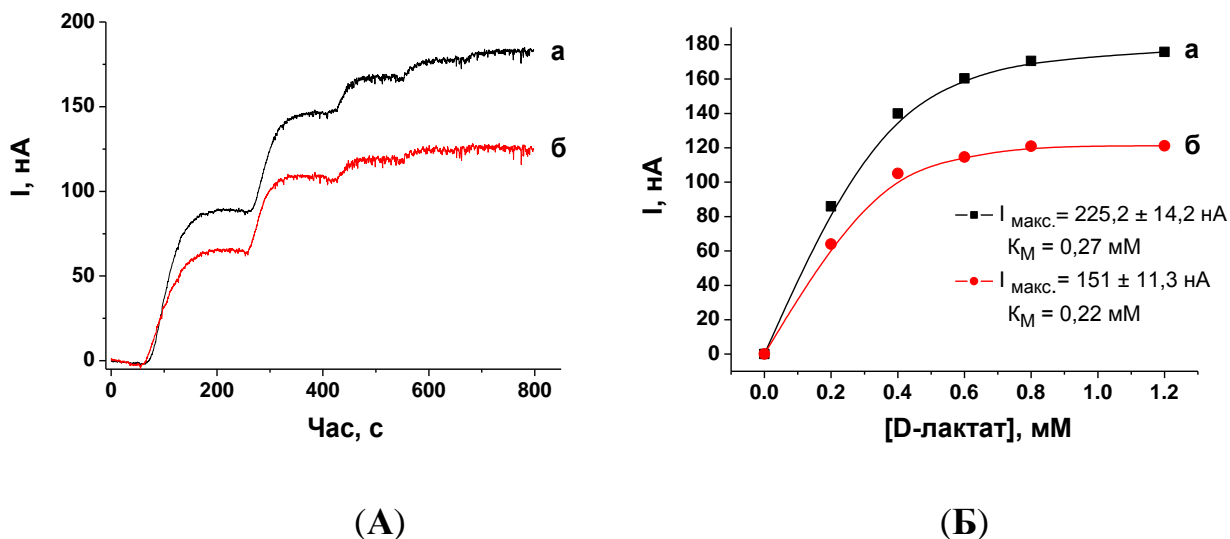


Рис. 3.58. Хроноамперометричні (А) та калібрувальні криві відгуку (Б) на внесення зростаючих концентрацій D-лактату, отримані з використанням біоелектродів із біензимною архітектурою (а) та біоелектродів без екзогенного цитохрому *c* (б). Умови: робочий потенціал 250 мВ проти Ag/AgCl у 50 мМ ФБ, рН 7,8. Наведено дані для типового експерименту.

Обидва варіанти сенсорних архітектур охарактеризовано максимальним струмом при насиченні субстратом ( $I_{\text{макс.}}$ ) та значенням позірної константи Міхаеліса-Ментен ( $K_M$ ). Для біензимного електроду  $I_{\text{макс.}}$  становило  $225 \pm 14 \text{ нА}$ , тоді як біоелектрод без екзогенного цитохрому *c* демонстрував значення  $I_{\text{макс.}}$  на рівні  $150 \pm 11 \text{ нА}$ , за аналогічних умов (Рис. 3.58). Значення  $K_M$  для D-лактату, розраховано із відповідних калібрувальних кривих для біензимного біоелектрода, є дещо вищим, ніж для моноензимного електрода ( $0,27 \text{ мМ}$  у порівнянні з  $0,22 \text{ мМ}$ , відповідно). Чутливість до D-лактату оцінена як  $61,6 \text{ А} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{м}^{-2}$  для біензимного біоелектрода і  $46,3 \text{ А} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{м}^{-2}$  для моноензимного. Порогова межа детекції для обох архітектур біоелектродів є близькою  $2,6 \text{ мкМ}$  D-лактату.

Для застосування біосенсора для аналізу D-лактату у реальних зразках велике значення має його селективність – тобто, відсутність сигналу на супутні речовини, наприклад: L-лактат, піруват, D-глюкоза, етанол. Величина амперометричного відгуку сконструйованого D-лактатного біосенсора була оцінена відносно зазначених сполук (Рис. 3.59).

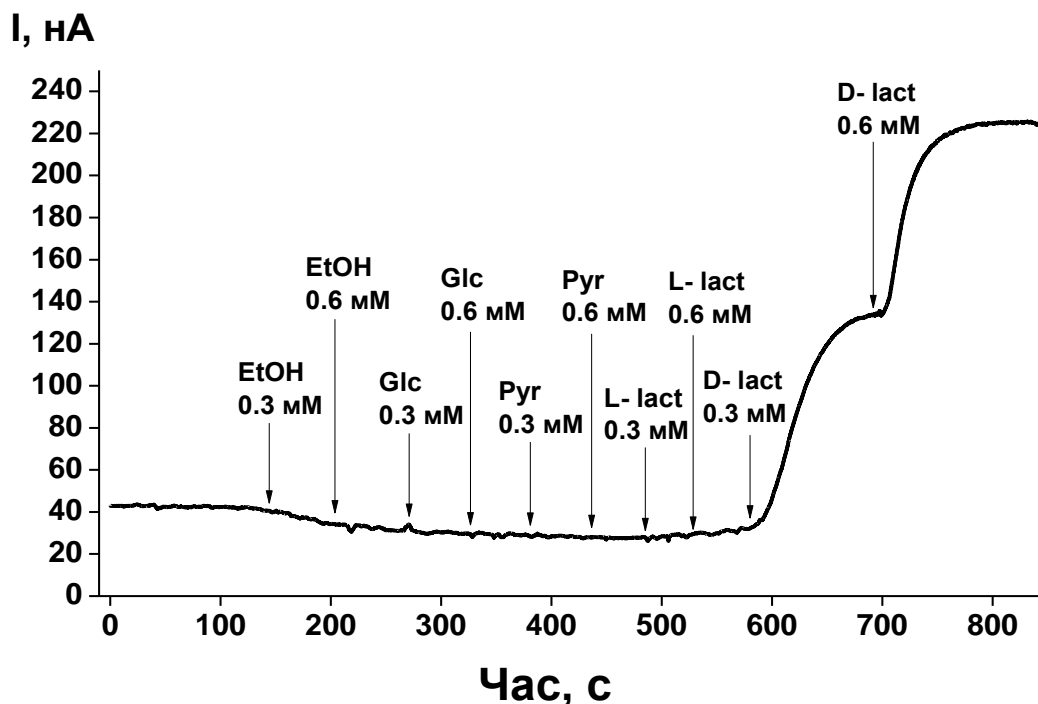


Рис. 3.59. Хроноамперограма відгуку біензимного D-лактат-селективного біосенсора при послідовному внесенні можливих інтерферуєючих речовин. Умовні позначки: EtOH – етанол; Glc – глюкоза; Pyr – піруват; L-lact – L-лактат; D-lact - D-лактат. Умови: робочий потенціал 250 мВ проти Ag/AgCl електроду порівняння в 50 мМ фосфатному буфері, рН 7,8. Примітка: відгук аналізували без проміжних промивань перед внесенням наступної речовини. Наведено дані для типового експерименту.

Розроблений прототип біензимного D-лактат-селективного сенсора демонструє високу селективність і не проявляє жодного побічного відгуку на

етанол, глюкозу, піруват чи L-лактат, які вносились у надлишкових кількостях (0,3 – 0,6 мМ) (Рис. 3.59). Водночас, величина відгуку на внесений D-енантіомер лактату, після послідовного внесення можливих інтерферуючих агентів, була аналогічною до рівня сигналу на D-лактат і відповідала  $\pm 100$  нА для 0,3 мМ D-лактату (Рис. 3.58 і 3.59).

Досліджено стабільність при зберіганні обох типів D-лактатних біосенсорів. Аналіз стабільності біоелектродів проводили при кімнатній температурі (24 °С), використовуючи 1 мМ D-лактат в 50 мМ фосфатному буфері, рН 7,8, що містив 0,2 мМ ФМСФ. Між аперометричними визначеннями біоелектроди зберігали у холодильнику при 4 °С (Таблиця 3.15).

Табл. 3.15.

Стабільність при зберіганні D-лактат-селективних біосенсорів. Наведено дані для типового експерименту

Залишковий відгук сенсора, % відносно початкового сигналу	Час зберігання, дні									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Моноензимний</b>	95,6	89,8	83,7	80,2	78,3	74,8	67,4	63,6	59,8	53,7
<b>Біензимний</b>	98,8	97,0	94,4	90,5	89,3	85,1	80,2	78,8	75,3	71,4

Дослідження стабільності біосенсорів свідчить, що їх можна використовувати більше 10 днів із періодичним зберіганням у буфері при +4 °С. 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* «trb» зумовлюється видаленням низькомолекулярних протеїназ

при руйнуванні клітин і наступних етапах їх промивання.

Основні характеристики розробленого біосенсора порівнювали з сенсором на основі ферменту DIDH з пекарських дріжджів, іммобілізованого у графітовій пасті [134]. Біосенсори на основі клітинних уламків «tr6» є більш чутливими (170 - 230 разів), ніж біосенсор на основі DIDH з пекарських дріжджів: їх чутливість складає  $61,6 \text{ A}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  та  $46,3 \text{ A}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  у порівнянні до  $0,27 \text{ A}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  ( $1,91 \text{ nA}\cdot\text{M}^{-1}$ ). Розроблені біосенсори характеризуються також нижчою межею виявлення D-лактату (2,6 мкМ) у порівнянні з 56 мкМ для DIDH-модифікованого пастоподібного електрода. Обидва біосенсори демонструють високу селективність та стабільність при зберіганні.

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

Як альтернативний варіант, у ролі біоелемента сенсора нами запропоновано пермеабілізовані клітини рекомбінантного штаму *O. polymorpha* «tr6» (*cyb2Δ pAOX-DLD1*). Для підвищення дифузії субстрату та медіатора всередину клітини і виведення продукту реакції та відновленого медіатора - у зворотньому напрямку, було використано пермеабілізацію клітинної стінки дріжджів 3 мМ цетилтримети амонійбромідом (ЦТАБ).

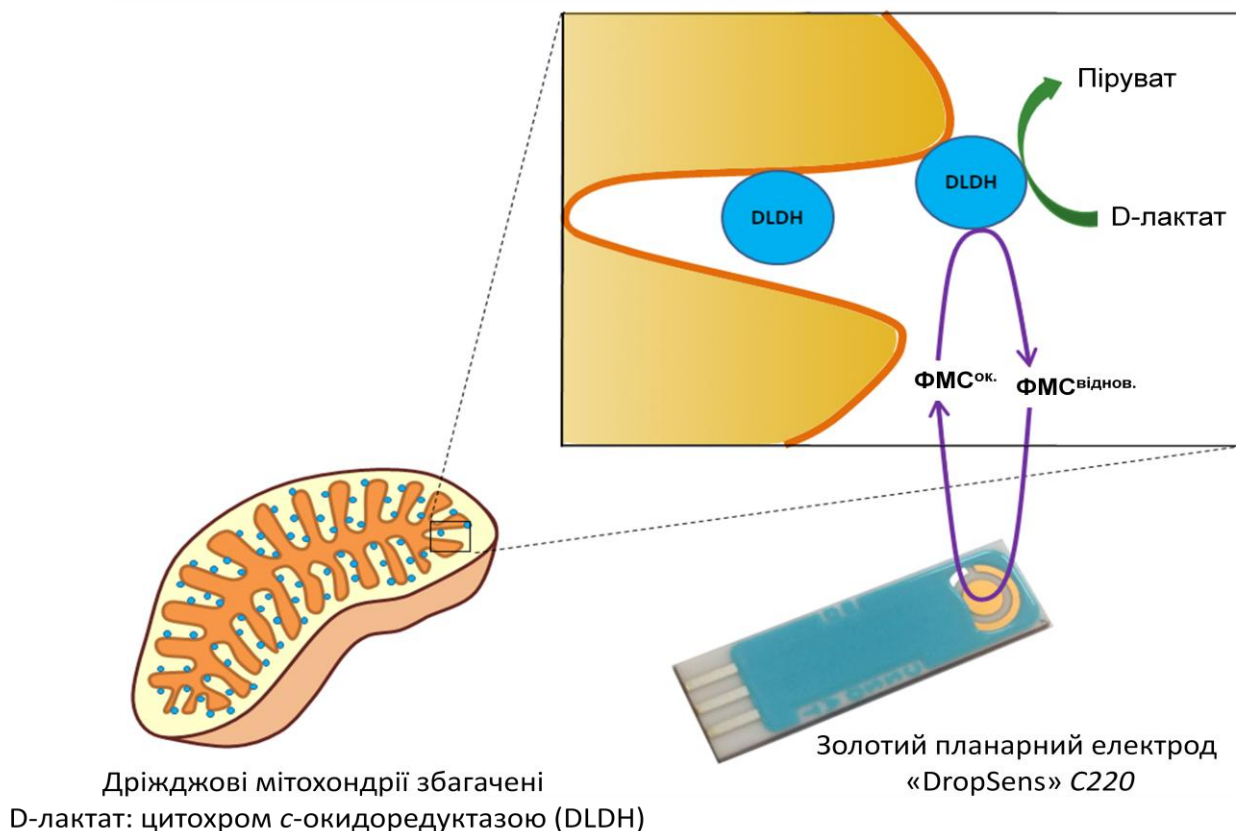


Рис. 3.60. Принципова схема D-лактат-селективних біосенсорів на основі використання пермеабілізованих клітин, клітинних уламків чи субклітинних фракцій, збагачених мітохондріями, з штаму *O. polymorpha* «tr6» та низькомолекулярного медіатора для перенесення елетронів.

Після відмивання, активність DLDH у фракції “тіней” складала  $20 \text{ Од} \cdot \text{мл}^{-1}$ , з концентрацією клітин  $40 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ . Біоселективна мембрана формувалась наступним чином: на поверхню 4 мм планарного золотого електроду C220 «DropSens» наносили 5 мкл пермеабілізованих клітин. Після висихання суспензії (10-15 хв при кімнатній температурі), поверх наносили 10 мкл розведеного в 10 разів катодного полімеру (GY 83-0270 005; рН 5,5). При цьому відбувалась преципітація полімеру і формувалась міцна полімерна плівка [217]. Для забезпечення перенесення електронів від відновленої форми ферменту, локалізованого в мітохондріях “тіней”, на поверхню робочого електроду, було

використано 0,2 мМ феназинметосульфат (ФМС) в ролі вільно-дифундуєчого медіатора.

Для забезпечення кращої селективності мікробних біоелектродів і усунення можливої інтерференції на сигнал з боку електроактивних сполук, робочий потенціал було знижено з +250 до +150 мВ. Варто відмітити, що робочий потенціал +150 мВ є достатнім для ефективного окислення відновленої форми ФМС на поверхні золотого електроду.

Електрохімічні властивості електродів із модифікованими пермеабілізованими клітинами *O. polymorpha* «tr6» досліджували за допомогою хроноамперометрії на базі стандартного амперометричного потенціостату *CNI 1200A* (IJ Cambria Scientific Ltd, Порт Барі, Великобританія) (Рис. 3.61).

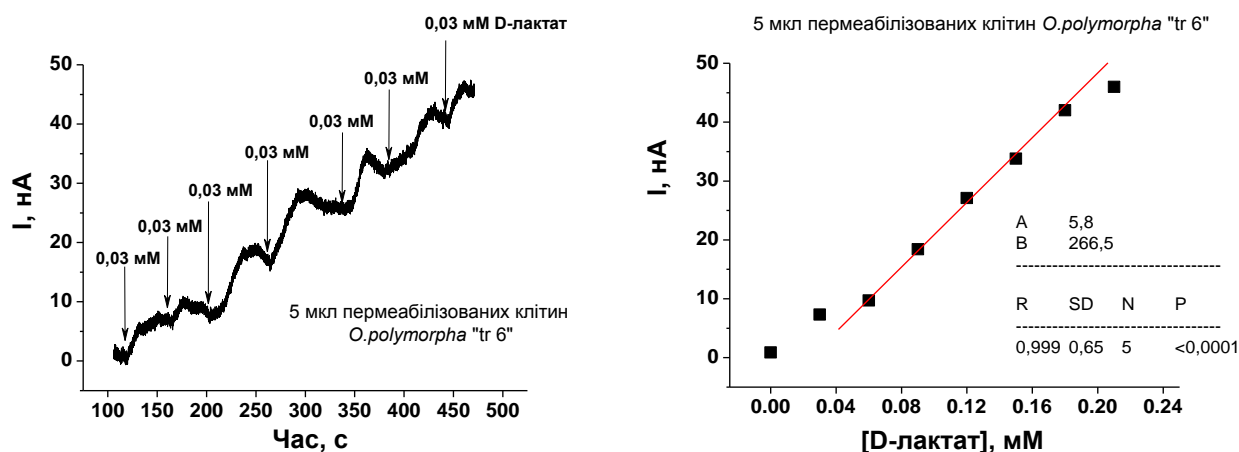


Рис. 3.61. Хроноамперограма (зліва) та калібрувальна крива відгуку на зростаючі концентрації D-лактату (справа) для 4 мм золотих планарних електродів «Dropsens» C220, модифікованих пермеабілізованими клітинами *O. polymorpha* «tr6» з ензиматичною активністю DLDH 10 Од·мл<sup>-1</sup> у присутності комерційного катодного полімера. Умови: робочий потенціал + 150 мВ проти Ag/AgCl електроду порівняння, 0,2 мМ ФМС, 0,5 Мм ФМСФ в 60 мМ фосфатному буфері, рН 7,8. Наведено дані для типового експерименту.

Як видно на Рис. 3.61, межі лінійності біоелектродів на основі пермеабілізованих клітин знаходяться в діапазоні від 0,06 мМ до 0,18 мМ D-лактату. Мінімальний відгук на аналіт (3  $\delta$  фонового сигналу) відповідав 0,03 мМ D-лактату, а чутливість у лінійному діапазоні становила 21,2 А·М<sup>-1</sup>·м<sup>-2</sup> (площа електроду складала 12,6 мм<sup>2</sup>).

Проведені дослідження підтвердили можливість використання пермеабілізованих клітин *O. polymorpha* «tr6», у поєднанні із вільнодифундуючим медіатором, у ролі біоселективного елемента D-лактат-селективного амперометричного біосенсора.

Для покращення аналітичних параметрів D-лактат-селективного мікробного сенсора нами використано субклітинні фракції *O. polymorpha* «tr6», збагачені мітохондріями.

Субклітинні фракції клітин *O. polymorpha* «tr6» отримували за модифікованою методикою Грегга [157] (див. розділ 2.3.3). Перед використанням субклітинні фракції, збагачені мітохондріями, розморожували при 4 °С. Активність DLDH, алкогольоксидази (АО) та концентрацію білка різних препаратів субклітинних фракцій клітин *O. polymorpha* «tr6», збагачених мітохондріями, аналізували за допомогою спектрофотометричних підходів. Активність DLDH субклітинні фракції, збагачені мітохондріями, становила 4,16 Од·мкг<sup>-1</sup>. Для підтвердження нативності ферменту всередині мітохондрій під час їх виділення було проведено флуоресцентну мікроскопію із використанням 2',7'-дихлорфлуоресцеїнового діацетату в якості барвника (DCFDA) (Рис. 3.62).



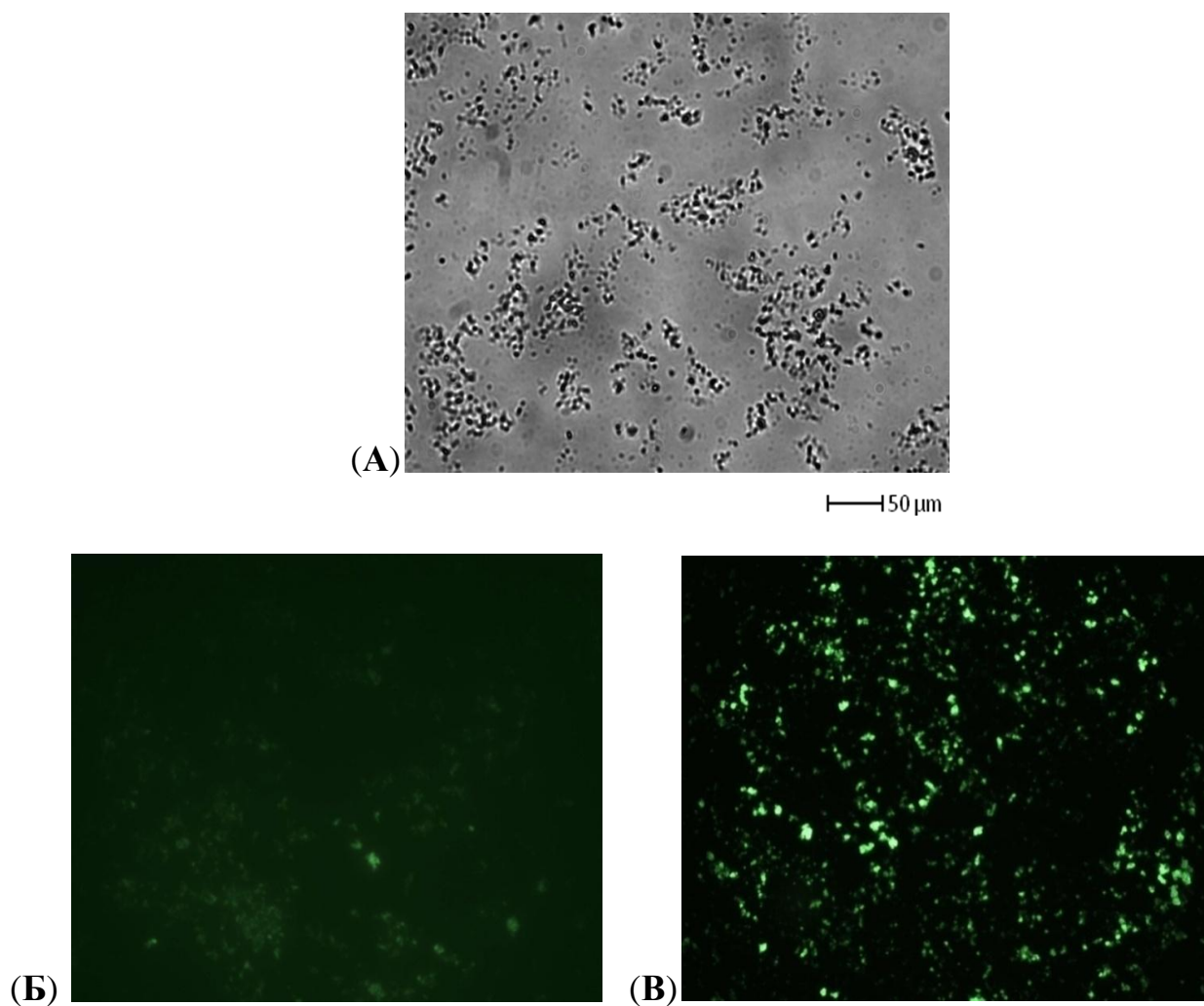


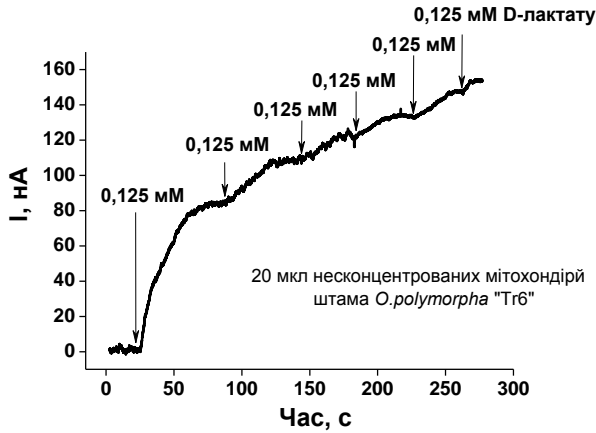
Рис. 3.62. Фазово-контрастна і флуоресцентна мікроскопія субклітинної фракції, збагаченої мітохондріями, виділеної з рекомбінантних клітин *O. polymorpha* «tr6». (А) фазово-контрастне зображення мітохондріальної фракції (збільшення кратно 100); (Б) флуоресцентне зображення субклітинної фракції, збагаченої мітохондріями, обробленої DCFDA без додавання D-лактату; (В) флуоресцентне зображення тієї ж фракції в присутності DCFDA і 18 мкМ D-лактату в якості субстрату DLDH.

DCFDA є специфічним барвником для активних форм кисню (ROS) [222]. Зазвичай в дріжджових мітохондріях за нативних умов ROS утворюються в малих кількостях. При використанні субклітинних фракцій, збагачених

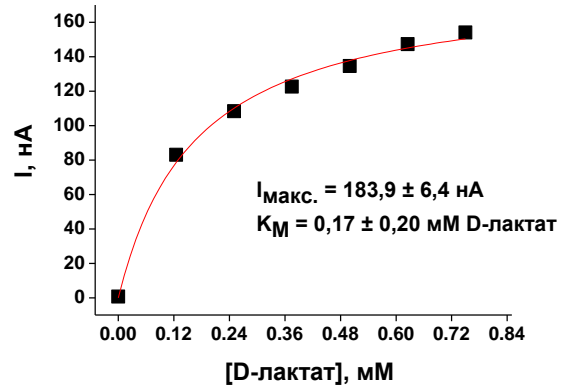
мітохондріями, виділених з клітин-надпродуцентів DLDH, підвищена активність DLDH провокує утворення високого ROS-рівня. Збільшення флуоресценції субклітинної фракції, збагаченої мітохондріями при внесенні D-лактату (Рис. 3.62, В) порівняно з флуоресценцією тієї ж фракції без будь-якої попередньої обробки D-лактатом (Рис. 3.62, Б) можна вважати свідченням нативності DLDH в отриманих препаратах субклітинної фракції, збагаченої мітохондріями.

Як і у випадку використання пермеабілізованих клітин, у ролі біоелемента D-лактат селективного сенсора при конструюванні біосенсора на основі субклітинних фракцій *O. polymorpha* «tr6», збагачених мітохондріями, як медіатор 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 електрода утримували комерційним катодним полімером GY 83-0270 005.

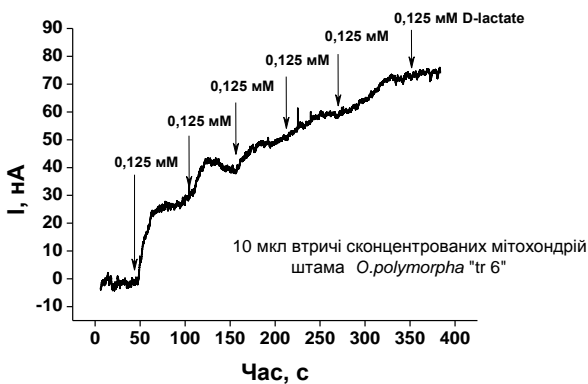
Для забезпечення оптимальних параметрів біосенсора (величини відгуку сигналу, чутливості та специфічності), підібрано товщину шару біоселективного елементу. Для цього, на поверхню одного робочого електрода наносили 20 мкл субклітинних фракцій клітин *O. polymorpha* «tr6», збагачених мітохондріями, з активністю DLDH 3 Од·мл<sup>-1</sup>, на поверхню іншого - 10 мкл тричі сконцентрованих субклітинних фракцій. Таким чином, у 2-му випадку було збільшено масу біоелемента в мембрані сенсора в 1,5 раза. Оцінку ефективності біоелектродів із різною масою біоелемента проводили за допомогою хроноамперометричного дослідження (Рис. 3.63).



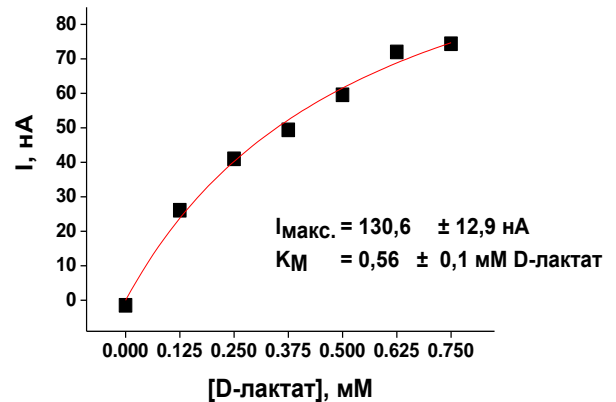
20 мкл несконцентрованих мітохондрій штама *O. polymorpha* "Тг6"



(А)



10 мкл втричі сконцентрованих мітохондрій штама *O. polymorpha* "tr 6"



(Б)

Рис. 3.63. Хроноамперограма (зліва) та калібрувальна крива відгуку (справа) на зростаючі концентрації D-лактату для 4 мм золотих планарних електродів «Dropsens» C220, модифікованих 20 мкл субклітинних фракцій клітин *O. polymorpha* «tr6», збагачених мітохондріями, з активністю DLDH 3 Од·мл<sup>-1</sup> (А) та в 1,5 раза більшою масою аналогічного біоелемента (Б). Умови: робочий потенціал + 150 мВ проти Ag/AgCl електроду порівняння, 0,2 мМ ФМС та 0,5 мМ ФМСФ в 60 мМ ФБ, рН 7,8. Наведено дані для типового експерименту.

Як видно із хроноамперограм та калібрувальних кривих на Рис. 3.63, при збільшенні маси біоелемента в 1,5 раза відгук сенсора ( $I_{\text{макс.}}$ ) знижувався із 184 нА до 130 нА (у 1,4 раза), а позірна константа Міхаеліса-Ментен ( $K_M$ ) для D-лактату зростала у 3,3 раза (із 0,17 мМ до 0,56 мМ), відповідно. Погіршення деяких характеристик біоелектродів із збільшеною товщиною шару біоелемента, можливо, зумовлене дифузійними перешкодами при збільшенні густини біоселективної мембрани, що утруднює проникнення D-лактату та ФМС. Тому для подальшої роботи використовувався несконцентрований препарат субклітинних фракцій *O. polymorpha* «tr6», збагачених мітохондріями.

Для покращення операційних параметрів біосенсора проводилось руйнування субклітинної фракції *O. polymorpha* «tr6», що дозволило зменшити дифузійний бар'єр між холоензимом DLDH, субстратом, медіатором та поверхнею робочого електроду. Осмотичний шок проводили за схемою, відповідно до описаної Анет Коч [223]. До субклітинних фракцій клітин *O. polymorpha* «tr6» у 10 мМ буферній системі (MOPS-КОН, 250 мМ сахароза, 1 мМ ЕДТА, рН 7,2), вносили 4 об'єми охолодженої води, тричі проводили заморожування (при  $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) з наступним розморожуванням при кімнатній температурі. Внаслідок осмотичного стресу та розморожування/заморожування відбувалось порушення компартментів субклітинних фракцій (мітохондрій, пероксисом і т.п.). Оцінку ефективності електронного перенесення на основі субклітинних фракцій, зруйнованих осмотичним шоком, як і в попередніх випадках, проводили хроноамперометрично (Рис. 3.64).

20 мкл мітохондріальних уламків клітин штама *O. polymorpha* "tr 6"

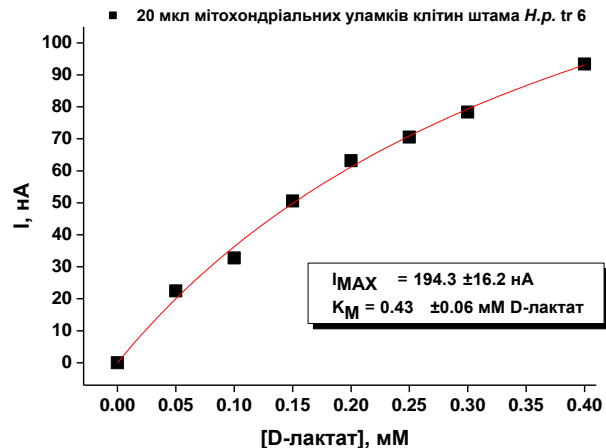
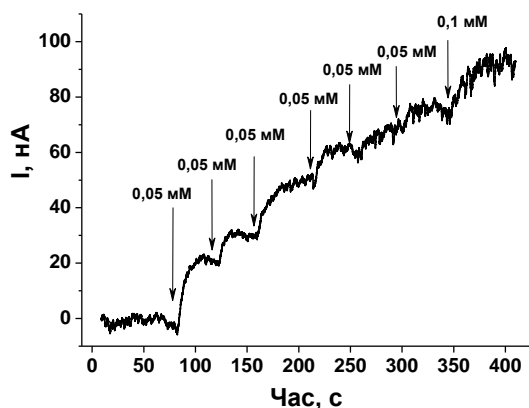


Рис. 3.64. Хроноамперограма (зліва) та калібрувальна крива відгуку на зростаючі концентрації D-лактату (справа) для 4 мм золотих планарних електродів «Dropsens» C220, модифікованих 20 мкл зруйнованих осмотичним шоком субклітинних фракцій клітин *O. polymorpha* «tr6», збагачених мітохондріями, з активністю DLDH 1,7 Од·мл<sup>-1</sup>. Умови: робочий потенціал +150 мВ проти Ag/AgCl електроду порівняння, 0,2 мМ ФМС та 0,5 мМ ФМСФ в 60 мМ фосфатному буфері, рН 7,8. Наведено дані для типового експерименту.

Незважаючи на те, що кінцева активність DLDH біоселективної мембрани знизилась у 1,8 раза (внаслідок розведення при руйнуванні осмотичним шоком), відгук сенсора зріс на 10 нА ( $I_{\max} = 194$  нА відносно 184 нА), у порівнянні із біоелектродами на основі не зруйнованих субклітинних фракцій (Рис. 3.63 і 3.64).

Таким чином, доведено, що внаслідок осмотичного руйнування субклітинних фракцій клітин *O. polymorpha* «tr6», збагачених мітохондріями, забезпечується більш ефективно електронне перенесення між компонентами системи: субстратом, ферментом, медіатором, поверхнею робочого електрода.

При конструюванні D-лактат-селективних біосенсорів, створених на основі пермеабілізованих клітин, клітинних уламків та субклітинних фракцій

*O. polymorpha* «tr6», використовували препарати біоелементів із характеристиками, наведеними в Таблиці 3.16.

Табл. 3.16.

Активність DLDH, АО та концентрація «тіней»/білка різних препаратів біоелементів D-лактат-селективних біосенсорів на основі *O. polymorpha* «tr6». Наведено дані для типового експерименту.

Питома активність	Пермеабілізовані клітини	Субклітинні фракції	Субклітинні фракції, зруйновані осмотичним шоком	Субклітинні фракції з лізованими пероксисомами
Активність DLDH об'ємна - Од·мл <sup>-1</sup> (масова - Од·мг <sup>-1</sup> )	20 (0,5)	3,0 (1,3)	1,7 (2)	3,5 (4,16)
Активність АОХ об'ємна - Од·мл <sup>-1</sup> (масова - Од·мг <sup>-1</sup> )	32 (0,8)	1,1 (0,48)	2,2 (2,6)	0,6 (0,7)
Концентрація клітин/білку, мг·мл <sup>-1</sup>	40	2,3	0,84	0,84

Внаслідок проведеної роботи по оптимізації типу та маси біоелемента D-лактат-селективних біосенсорів на основі *O. polymorpha* «tr6» показано, що найвищий сигнал на D-лактат спостерігається для системи: D-лактат / збагачені мітохондріями субклітинні фракції / ФМС / золотий планарний електрод, тому

для дослідження детальних характеристик було використано саме таку архітектуру.

Межа чутливості біоелектродів на основі збагачених мітохондріями субклітинних фракцій *O. polymorpha* «tr6» досліджувалась роноамперометрично і оцінювалась як 3- $\sigma$  базового сигналу (межі коливання фонового сигналу після повного зрівноваження амперометричної системи) (Рис. 3.65).

20 мкл несконцентрованих мітохондрій клітин штама *O. polymorpha* "tr6"

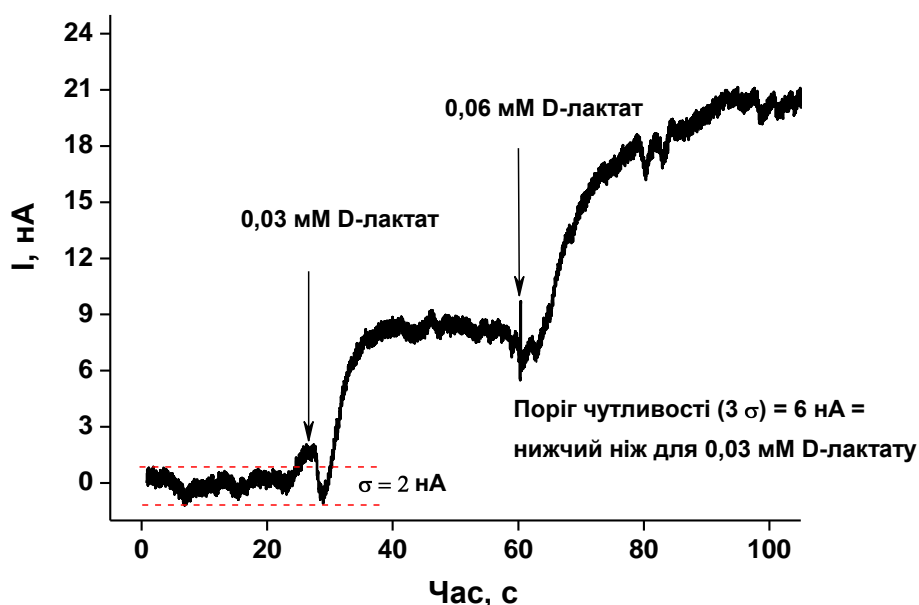


Рис. 3.65. Хроноамперограма відгуку на D-лактат 4 мм золотих планарних електродів «Dropsens» C220, модифікованих субклітинними фракціями клітин *O. polymorpha* «tr6», збагачених мітохондріями з активністю DLDH  $1,7$  Од·мл<sup>-1</sup>. Умови: робочий потенціал + 150 мВ проти Ag/AgCl електроду порівняння, 0,2 мМ ФМС та 0,5 мМ ФМСФ у 60 мМ фосфатному буфері, рН 7,8.

З хроноамперограми на Рис. 3.65 можна зробити висновок, що ліміт визначення (поріг чутливості) біоелектродів є нижчим за 0,03 мМ D-лактату.

Межі лінійності та чутливість біоелектродів на основі субклітинних фракцій клітин *O. polymorpha* «tr6», збагачених мітохондріями, проаналізовано на основі калібрувальних графіків (Рис. 3.66).

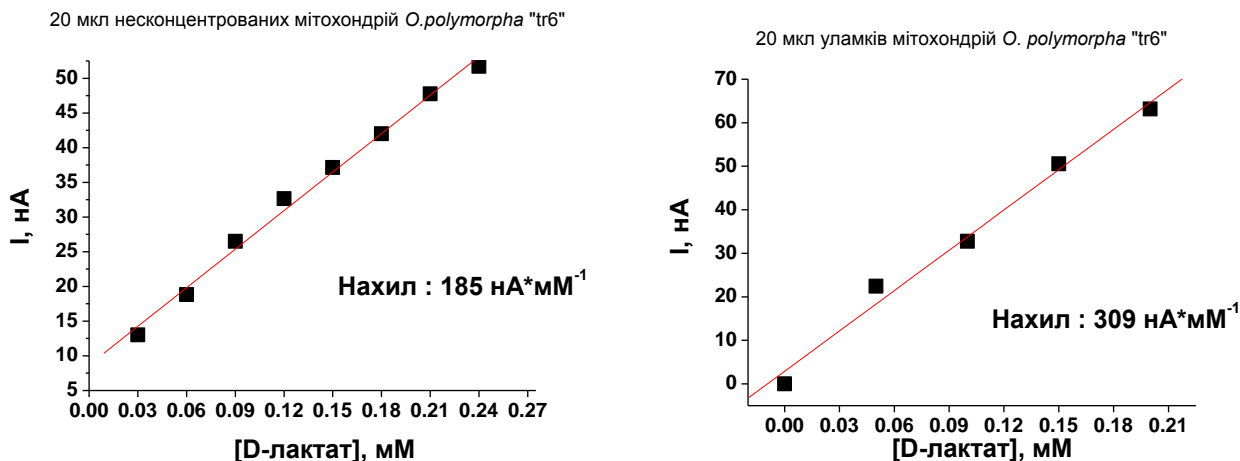


Рис. 3.66. Калібрувальні криві відгуку на зростаючі концентрації D-лактату для 4 мм золотих планарних електродів «Dropsens» C220, модифікованих незруйнованими (зліва) та зруйнованими осмотичним шоком (справа) субклітинними фракціями клітин *O. polymorpha* «tr6», збагачених мітохондріями. Умови: робочий потенціал +150 мВ проти Ag/AgCl електроду порівняння, 0,2 мМ ФМС та 0,5 мМ ФМСФ в 60 мМ фосфатному буфері, рН 7,8. Наведено дані для типового експерименту.

Чутливість 4 мм D-лактат-селективного біоелектроду (робоча площа 12,6 мм<sup>2</sup>) на основі незруйнованих субклітинних фракцій, збагачених мітохондріями, становила 14,7 А·М<sup>-1</sup>·м<sup>-2</sup> (Рис. 3.66, зліва). Водночас, для біоелектроду на основі зруйнованих субклітинних фракцій збагачених мітохондріями, чутливість була у 1,7 раза вищою і відповідала 24 А·М<sup>-1</sup>·м<sup>-2</sup> (Рис. 3.66, справа). Для обох типів D-лактат-селективних біоелектродів верхня межа лінійного діапазону відповідала 0,21 мМ D-лактату (Рис. 3.66).



Стабільність прототипу D-лактат-селективного сенора на основі субклітинних фракцій клітин *O. polymorpha* «tr6», збагачених мітохондріями, характеризували за відгуком біоелектродів на 0,2 мМ D-лактат в динаміці їх зберігання (Таблиця 3.17).

Табл. 3.17.

Стабільність при зберіганні прототипу D-лактат-селективного сенсора на основі субклітинних фракцій клітин *O. polymorpha* «tr6», збагачених мітохондріями.

Наведено дані для типового експерименту.

	Час зберігання, доби					
	1	2	3	4	5	6
Залишковий відгук сенсора, % відносно початкового сигналу	95,6	80,7	76,3	67,4	59,8	50,7

Стабільність біоелектродів характеризували як залишковий відгук сенсора (%) відносно початкового сигналу (у перший день вимірювання). Було досліджено, що «півжиття сенсора» (50 % величини початкового сигналу) припадала на 6-ту добу його зберігання при +4 °С (Табл. 3.17). Таким чином, сенсор може використовуватись для визначення D-лактату протягом 6-ти днів, при умові recalібрації стандартним розчином D-лактату. Варто зазначити, що прототип D-лактат-селективного сенора на основі субклітинних фракцій клітин *O. polymorpha* «tr6», збагачених мітохондріями, демонструє задовільну стабільність у порівнянні із описаними біосенсорами “другого покоління”.

Розроблений прототип D-лактат-селективного біосенсора було апробовано на реальних зразках молочних продуктів (2,6 % ультрапастеризоване молоко ”Селянське особливе” та 1 % питний йогурт без цукру, ”Галичина”). Зразки

молочної продукції було депротейнізовано 5 % трихлороцтовою кислотою (кінцева концентрація) з усуненням білкових фракцій методом центрифугування (15 хв. при 12000 g та 4 °C). Після нейтралізації зразків 2 М NaOH до значення рН, близького 7,5, зразки заморожували при -20 °C до подальшого їх використання. Шляхом підбору оптимального розведення дослідних зразків, для точного вимірювання D-лактату, було визначено, що оптимальним розведенням для зразків йогурту є 350 разів, а для зразків молока – 20 раз (Рис. 3.67).

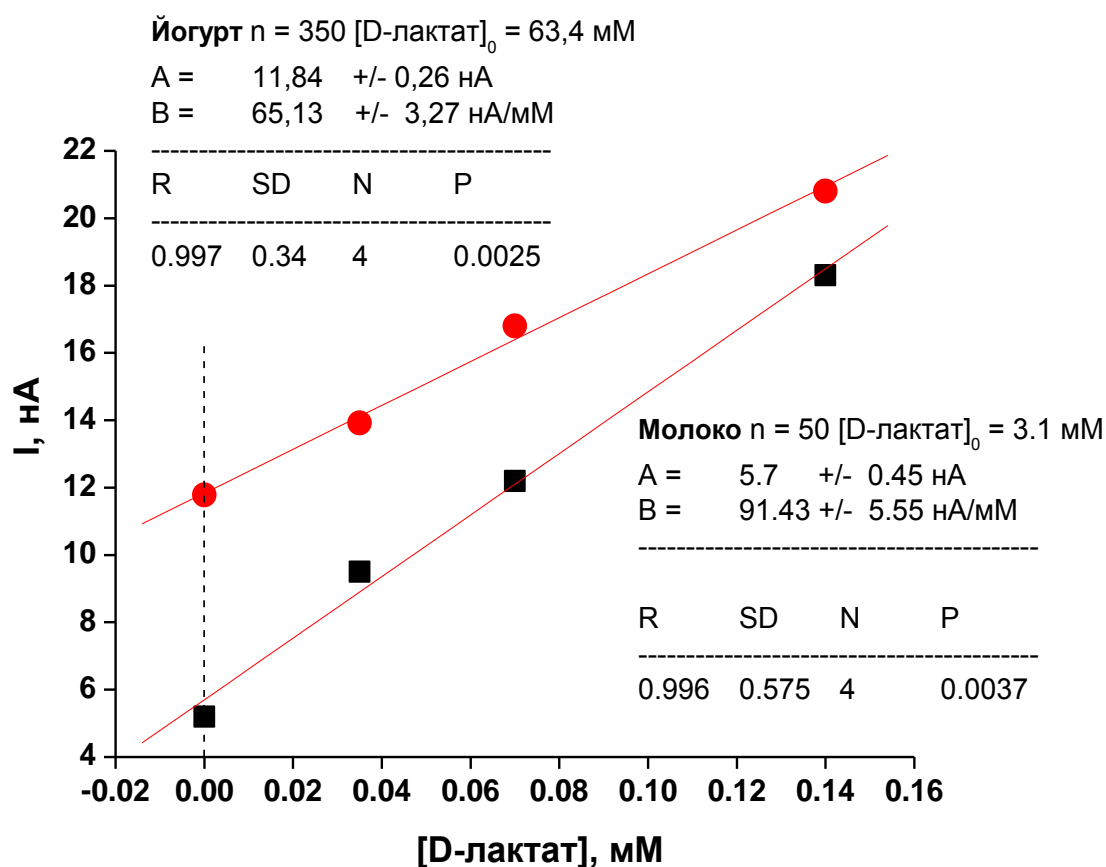


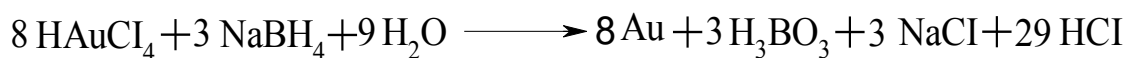
Рис. 3.67. Калібрувальні криві для визначення вмісту D-лактату в зразках молока та питного йогурту методом «множинних внесень стандарту» розробленим прототипом D-лактат-селективного біосенсора. Наведено дані для типового експерименту.

Отже, методом множинних внесень стандарту за використання розробленого D-лактат-селективного біоелектрода було визначено, що в питному йогурті рівень D-лактату складав 63,4 мМ, а для ферментованого молока - 3,1 мМ (Рис. 3.67). Таким чином, для досліджених зразків молочних продуктів, отримані результати добре корелюють із літературними даними, межі яких коливаються від 29 до 122 мМ (для йогурту) та 3,1 - 4,4 мМ (у молоці), відповідно [100, 208]. Підвищення концентрації D-лактату в молочних продуктах, а також вині і пиві, свідчить про зниження їх якості, псування і може слугувати методом контролю відповідності даних продуктів харчовим нормам при їх сертифікації.

### **3.6.2. Конструювання мікробних біосенсорів на L-лактат за використання рекомбінантних клітин *O. polymorpha* «tr1» і біофункціоналізованих наночастинок золота**

#### **3.6.2.1. Приготування та характеристика наночастинок золота та їх біофункціоналізація для використання в сенсорних технологіях**

Золоті наночастинки (Au-НЧ) готували методом відновлення іонів металу з розчину відповідної кислоти. Відновлюючим агентом слугував  $\text{NaBH}_4$ .



Вихід золотих наночастинок при такому методі синтезу, складав близько 80 % (розрахунок вели на підставі калібрування гравіметричним методом). Спектрофотометричні дослідження отриманих наночастинок проводили на спектрофотометрі Shimadzu (UV – 1650 PC), в діпазоні 250-800 нм (Рис. 3.68).

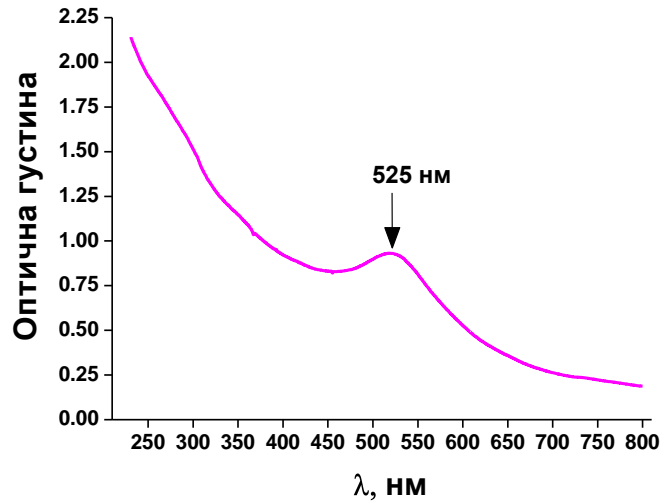


Рис. 3.68. Загальний вигляд (зліва) та спектр світлопоглинання (справа) отриманих золотих наночастинок.

Відомо, що спектр поглинання в ультрафіолетовій та видимій ділянці досить чутливий до утворення колоїдів металів [224]. Синтезовані золоті наночастинок характеризуються чітким піком абсорбції при 525 нм внаслідок поверхневого плазмонного збудження (Рис. 3.68), що є типовим для наночастинок золота [225]. Окрім того, дифракційні параметри Au-НЧ дають змогу говорити про приблизний їх розмір, що знаходиться у діапазоні 15-30 нм [226].

Для вивчення можливості використання Au-НЧ, як носіїв ферментів, проведено більш детальне фізико-хімічне та структурне дослідження їх характеристик за використання скануючої електронної мікроскопії (СЕМ), рентгеноспектрального аналізу (РСМ), атомно-силової мікроскопії (АСМ) та трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ).

За допомогою рентгеноспектрального аналізу підтверджено формування наночастинок Au<sup>0</sup>, а СЕМ зображення дало змогу оцінити середній розмір Au-НЧ (Рис. 3.69).

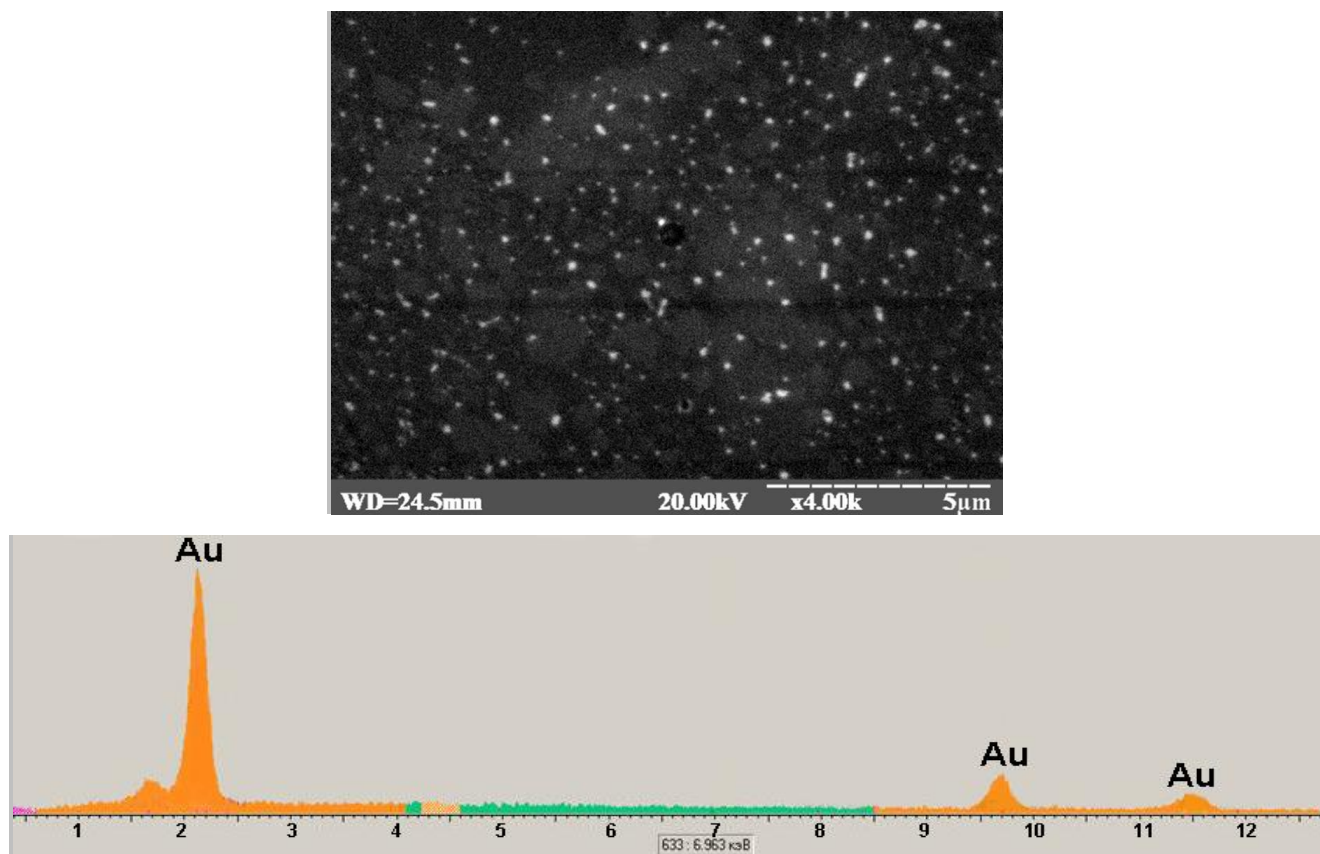


Рис. 3.69. Мікрофотографії Au-НЧ, зроблені за допомогою СЕМ (зверху) та РСМ (знизу). *Позначення:* WD - відстань від лінзи мікроскопа до зразків (мм); kV - прискорююча напруга; x - кратність збільшення; μm (мкм) - одиниця вимірювання.

Результати СЕМ-аналізу показують, що середній діаметр Au-НЧ є меншим за 50 нм, а дані РСМ підтверджують утворення частинок Au<sup>0</sup> з типовим піком К $\alpha$  при 2,1 кеВ (Рис. 3.69).

Середній розмір Au-НЧ було встановлено методом атомно-силової мікроскопії на мікроскопі NTEGRA Prima (NT-MDT). Аліквоту суспензії золотих наночастинок наносили на поверхню очищеної слюди та висушували на повітрі. Проби аналізували «tapping» методом з резонансною частотою 80 кГц, скануючою швидкістю 1 Гц та роздільною здатністю 256×256 пікселів (Рис. 3.70).

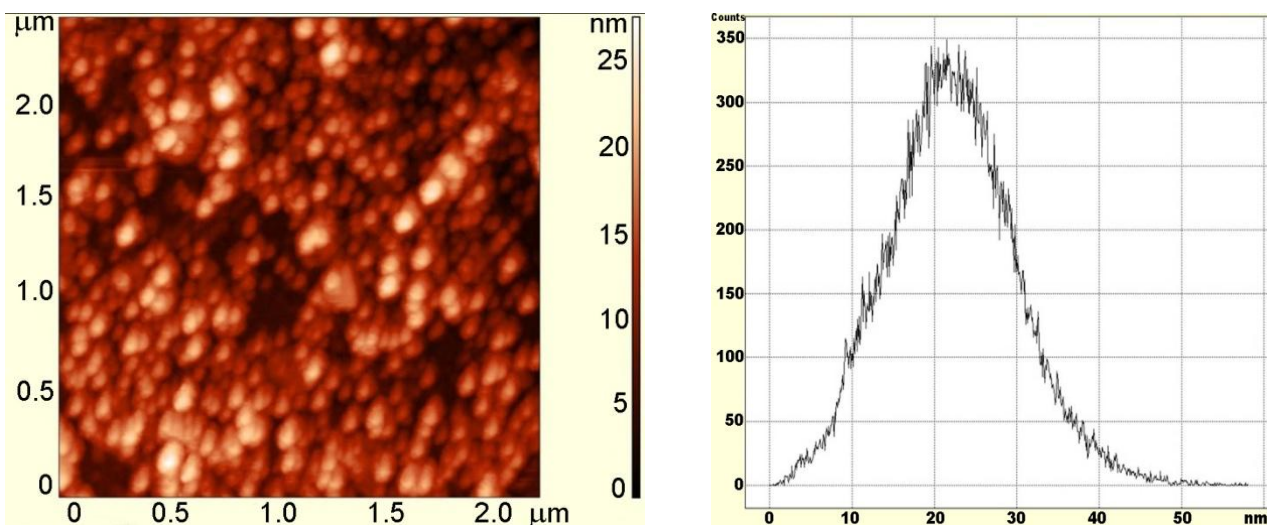


Рис. 3.70. Топографічна атомно-силова мікроскопія Au-НЧ та гістограма розподілу наночастинок за розміром. На осі абсцис показано поперечний розмір частинок (нм), а на осі ординат – число сканованих частинок.

Дані АСМ-досліджень підтверджують утворення Au-НЧ з середнім розміром наночастинок в діапазоні від 20 до 25 нм (Рис. 3.70).

Морфологію синтезованих Au-НЧ характеризували методом TEM на трансмісійному електронному мікроскопі ПЕМ-100 (Рис. 3.71).

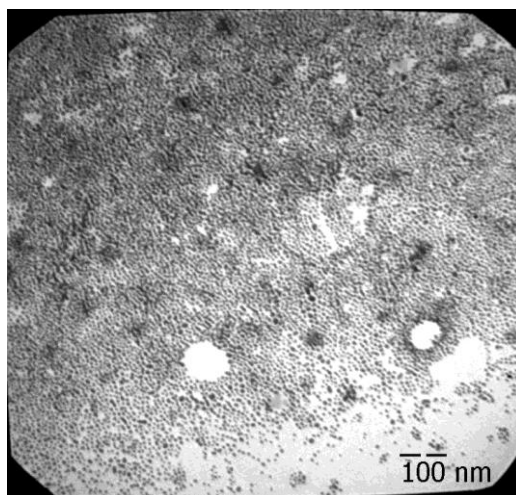


Рис. 3.71. TEM-мікрофотографія Au-НЧ.

Мікрофотографії TEM показують, що Au-НЧ у переважній більшості є однорідними частинками правильної кулястої форми з гомогенною поверхнею (Рис. 3.71).

### **3.6.2.2. Імобілізація флавоцитохрому $b_2$ на поверхні золотих наночастинок**

Для функціоналізації синтезованих наночастинок їх осаджували центрифугуванням при 9700 g протягом 40 хв, промивали 4 рази 5 мМ фосфатним буфером (ФБ), рН 7,5, знову осаджували та вносили 10 мМ водний розчин цистеаміну з подальшою інкубацією протягом ночі при + 4 °С. Після цього наночастинок відмивали тричі 5 мМ ФБ, рН 7,5 та знову ресуспендували у 100 мкл 5 мМ ФБ, рН 7,5.

Біофункціоналізація модифікованих цистаміном Au-НЧ з концентрацією 0,17 мМ проводилась шляхом додавання очищеного ФЦ  $b_2$  з питомою активністю 22 Од·мл<sup>-1</sup> у співвідношенні 2:1. Суміш інкубували при +4 °С протягом ночі. Біофункціоналізовані наночастинок (ФЦ  $b_2$ -Au-НЧ) промивали тричі 5 мМ ФБ, рН 7,5. Осадження ФЦ  $b_2$ -Au-НЧ здійснювали шляхом центрифугування при 9700 g протягом 20 хв. Аналіз ферментативної активності ФЦ  $b_2$  на різних етапах біофункціоналізації Au-НЧ представлено у Табл. 3.18.

Табл. 3.18.

Ферментативна активність ФЦ  $b_2$  на різних етапах біофункціоналізації Au-НЧ

	ФЦ $b_2$ до іммобілізації	Супернатант після іммобілізації	Промив 1	Промив 2	Промив 3	Промив 4	Іммобілізова- ний на Au- НЧ ФЦ $b_2$
V, мл	0,1	0,19	0,3	0,3	0,3	0,3	0,1
VA, Од.·мл <sup>-1</sup>	22,00 ±0,30	3,70± 0,04	1,50± 0,23	2,00± 0,02	1,10± 0,01	-	3,30± 0,02
∑ A, Од.	2,20	0,70	0,45	0,60	0,33	-	0,33
Процент від вихідної активності, %	=100	31,8	20,5	27,3	15,0	-	15,0

Позначення: V – об'єм; VA – питома об'ємна активність; ∑ A – сумарна кількість одиниць фермента

Вихід іммобілізованого на Au-НЧ ФЦ  $b_2$  становив 15 %, що відповідало 3,3 Од.·мл<sup>-1</sup> активності фермента (Табл. 3.18).

Дослідження стабільності при зберіганні ФЦ  $b_2$ , іммобілізованого на поверхні Au-НЧ, порівнювали зі стабільністю фермента в розчині (Рис. 3.72).



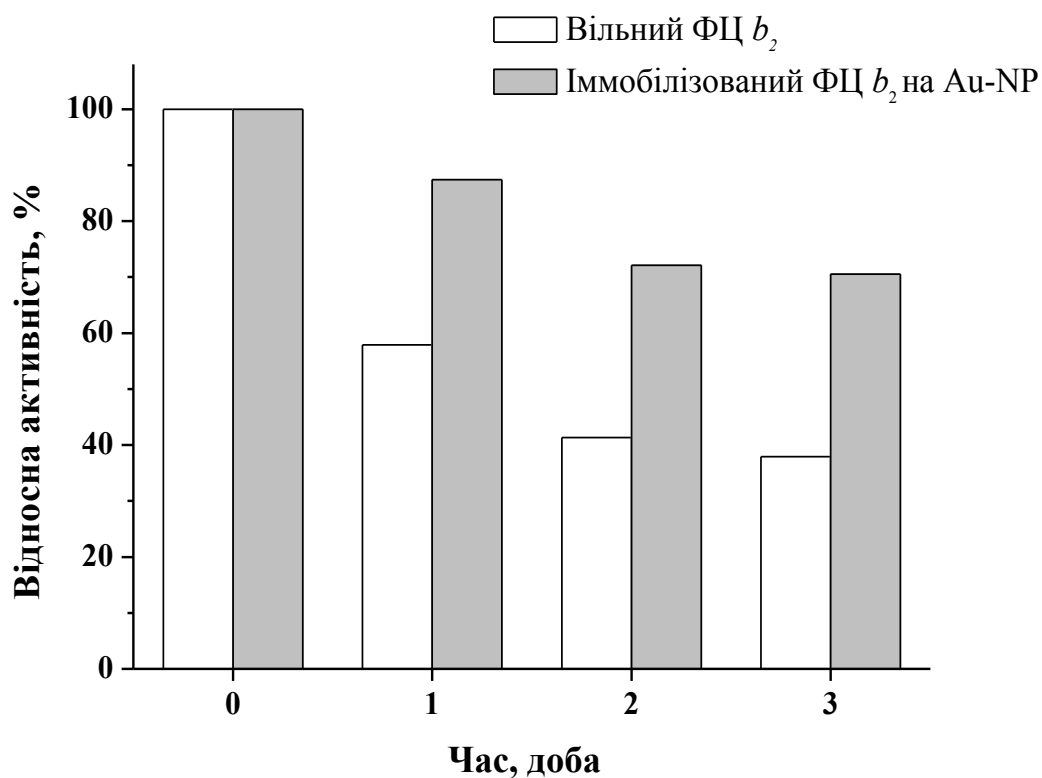


Рис. 3.72. Стабільність ферменту ФЦ  $b_2$  при його зберіганні в розчині та на поверхні Au-НЧ при  $+4^\circ\text{C}$ . Наведено дані для типового експерименту.

Із результатів дослідження стабільності ФЦ  $b_2$  при його зберіганні в розчині та в іммобілізованому стані на поверхні Au-НЧ при  $+4^\circ\text{C}$  випливає, що іммобілізація ФЦ  $b_2$  на поверхні Au-НЧ має значний стабілізуючий ефект. Цікавим є те, що із збільшенням тривалості зберігання стабілізуючий ефект Au-НЧ на активність фермента зростає від 30 % на першу добу, до 45 % на третю добу зберігання при  $+4^\circ\text{C}$ .

Отримані ФЦ  $b_2$ -Au-НЧ із активністю фермента  $3,3 \text{ Од} \cdot \text{мл}^{-1}$  у подальшому було використано для збагачення клітин *O. polymorpha* «tr1» цільовим ферментом при конструюванні мікробного біосенсора на L-лактат.

### 3.6.2.3. Конструювання L-лактат-селективного мікробного біосенсора на основі клітин *O. polymorpha* «tr1», збагачених ФЦ $b_2$ , іммобілізованим на золотих наночастинках

Ідею введення екзогенного ферменту в клітини для збільшення в них кількості 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) з використанням нанотехнологічного підходу - шляхом введення в клітини ФЦ  $b_2$ , іммобілізованого на золотих наночастинках (ФЦ  $b_2$ -Au-НЧ).

Для додаткового 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 Од·мг<sup>-1</sup> білку в безклітинних екстрактах або 4,45 Од·мг<sup>-1</sup> для пермеабілізованих клітин. Аналіз ферментативної активності збагачених інтактних та пермеабілізованих рекомбінантних дріжджових клітин, а також контрольних зразків (без внесення екзогенного ФЦ  $b_2$ -Au-НЧ), представлено у Таблиці 3.19.

Табл. 3.19.

Ферментативна активність рекомбінантних клітин *O. polymorpha* «tr1», збагачених ФЦ  $b_2$ -Au-НЧ. Наведено дані для типового експерименту

	V, мл	ПА, Од.·мг <sup>-1</sup>	$\sum$ А, Од.	Процент від вихідної активності, %
<b>Інтактні клітини</b>				
<b>Зразок</b> (ФЦ $b_2$ -Au-НЧ- клітини)	0,3	1,87±0,18	<b>0,56</b>	156
<b>Контроль</b> (клітини)	0,3	1,2±0,01	0,36	100
<b>Пермеабалазовані клітини</b>				
<b>Зразок</b> (ФЦ $b_2$ -Au-НЧ-клітини)	0,3	10,3±0,56	<b>3,1</b>	233
<b>Контроль</b> (клітини)	0,3	4,45±0,02	1,33	100

Позначення: V – об'єм; ПА – питома масова активність;  $\sum$  А – сумарна кількість одиниць фермента

Для непермеабілізованих клітин, їх збагачення ФЦ  $b_2$ -Au-НЧ (з вихідною активністю ФЦ  $b_2$  3,3 Од·мл<sup>-1</sup>) призводить до 1,56-кратного підвищення ферментативної активності. Для пермеабілізованих клітин, ефективність збагачення була суттєво вищою - у 2,33 раза. Таким чином, питома активність ФЦ  $b_2$  інтактних клітин після збагачення збільшилась до 56 %, а для пермеабілізованих клітин - до 133 % (Табл. 3.19). Це можна пояснити кращою проникністю пермеабілізованих клітин для ФЦ  $b_2$ -Au-НЧ.

Морфологічна характеристика дріжджових клітин на різних етапах збагачення ФЦ  $b_2$ -Au-НЧ проводилась за допомогою ТЕМ (Рис. 3.73).

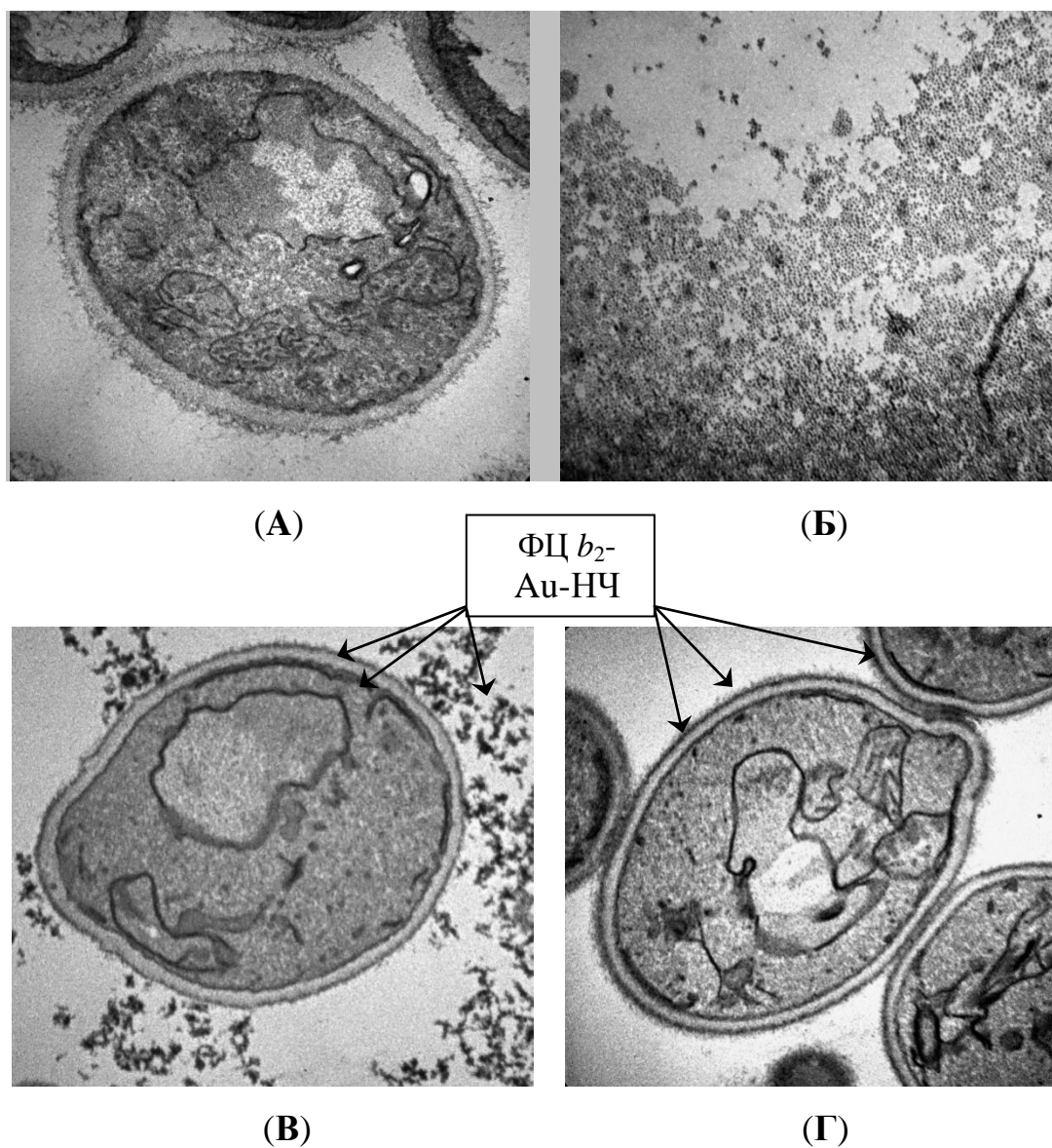
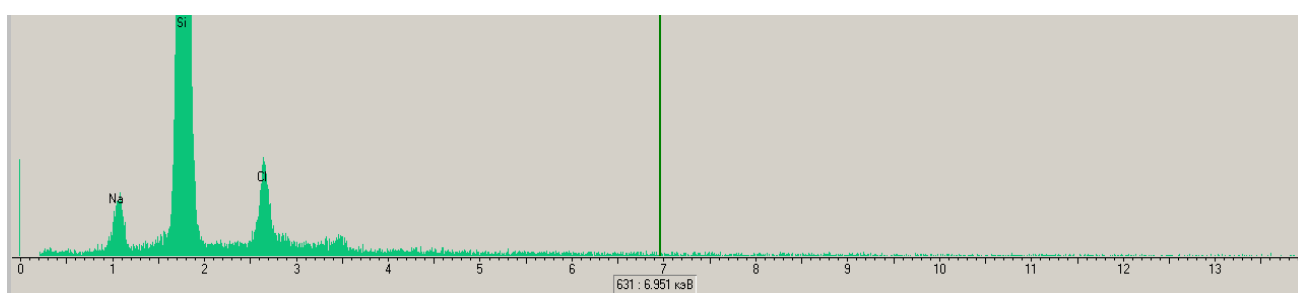


Рис. 3.73. Мікрофотографії TEM: інтактні дріжджові клітини *O. polymorpha* «tr1» (Контроль) (А); суспензія ФЦ  $b_2$ -Au-НЧ (Б); пермеабілізовані джіжджові клітини, оброблені ФЦ  $b_2$ -Au-НЧ (В); пермеабілізовані джіжджові клітини, оброблені ФЦ  $b_2$ -Au-НЧ, після промивання (Г).

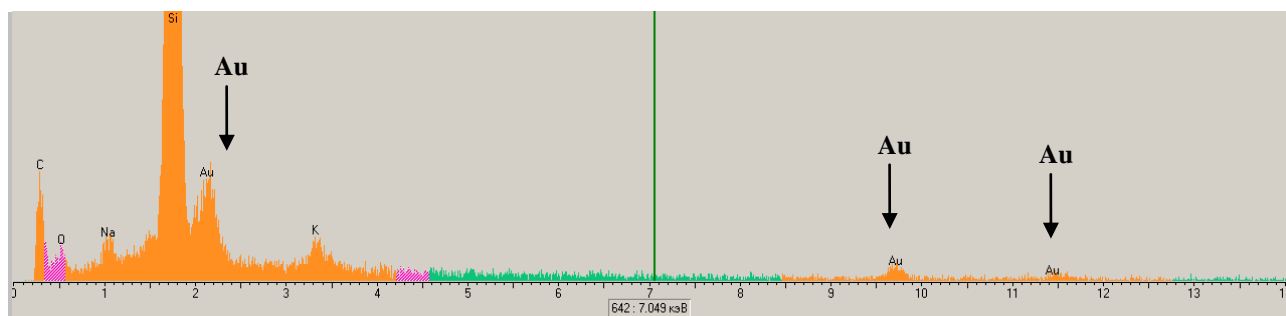
ТЕМ-зображення інтактних клітин *O. polymorpha* «tr1» використовували як контроль для аналізу морфологічної модифікації дріжджових клітин (Рис. 3.73, А). На Рис. 3.73 (Б) видно численні темні цятки, які відповідають ФЦ  $b_2$ -Au-НЧ. Внаслідок проникнення ФЦ  $b_2$ -Au-НЧ у пермеабілізовані дріжджові клітини,

клітинні стінки і мембрани стали темнішого забарвлення (Рис. 3.73, В). На рисунку 3.73 (Г) показано пермеабілізовані джіжджові клітини, оброблені ФЦ  $b_2$ -Au-НЧ, після повторного відмивання незв'язаних біонаночатинок. Після промивання, клітинна стінка залишається темного забарвлення, що підтверджує локалізацію ФЦ  $b_2$ -Au-НЧ всередині дріжджових клітин (Рис. 3.73, Г).

Проникнення ФЦ  $b_2$ -Au-НЧ всередину пермеабілізованих джіжджових клітин підтверджено також за використання рентгеноспектрального аналізу (РСМ) (Рис. 3.74).



(А)



(Б)

Рис. 3.74. РСМ-зображення пермеабілізованих джіжджових клітин до (А) та після їх збагачення ФЦ  $b_2$ -Au-НЧ (Б).

Рентгенівська спектрограма (Рис. 3.74) показує присутність  $Au^0$  всередині пермеабілізованих клітин (пік  $K\alpha$  при 2,1 кеВ, характерний для  $Au^0$ ), що підтверджує проникнення ФЦ  $b_2$ -Au-НЧ у дріжджові клітини.

Зображення, отримані за допомогою різних підходів, підтверджують зв'язування ФЦ  $b_2$ -Au-НЧ з поверхнею клітин та їх проникнення і накопичення всередині пермеабілізованих клітин.

Отримані збагачені клітини *O. polymorpha* «tr1» з сумарною кількістю одиниць фермента 3,1 використано для конструювання мікробного біосенсора для аналізу L-лактату.

При конструюванні L-лактат-селективного клітинного біосенсора в ролі вільнодифузійного редокс-медіатора використовували 2 мМ феназинметосульфат (ФМС), який забезпечує перенесення електронів між графітовим робочим електродом і ФЦ  $b_2$ , що знаходиться у вільній формі за рахунок експресії гена *CYB2* і в зв'язаному стані з Au-НЧ. ФМС може легко проникати всередину пермеабілізованих клітин і, після отримання електрону з відновленого ферменту, окислюватись на поверхні графітового робочого електроду (Рис. 3.75).

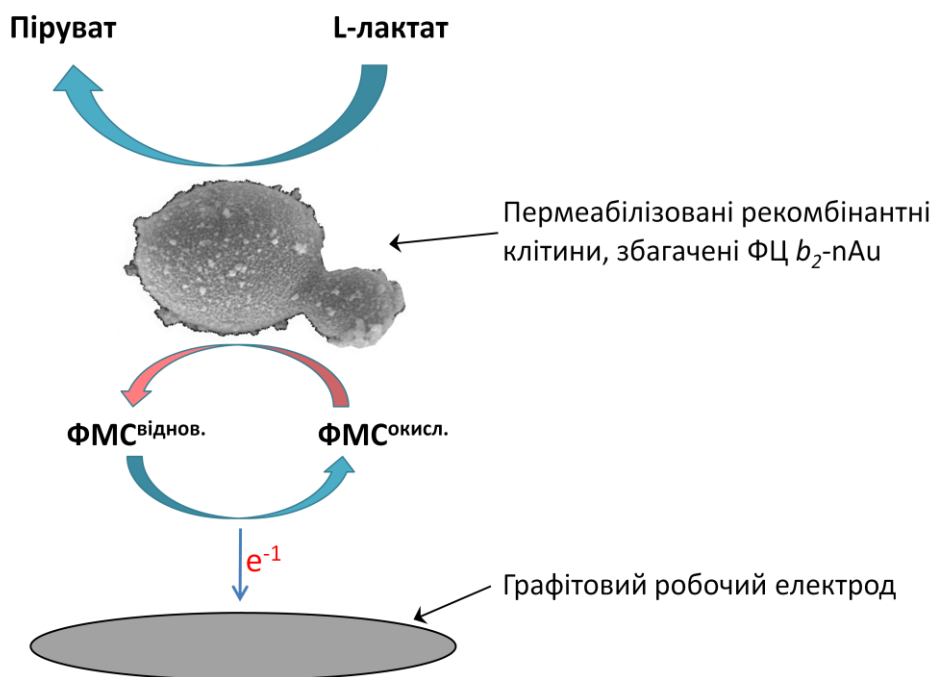


Рис. 3.75. Схема електронного перенесення у біорозпізнаючому шарі L-лактат-селективного біосенсора на основі рекомбінантних клітин дріжджів, збагачених ФЦ  $b_2$ -Au-НЧ.

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. Циклічна вольтамперометрія також дає інформацію про оптимальний робочий потенціал окислення ФМС на графітових робочих електродах (Рис. 3.76).

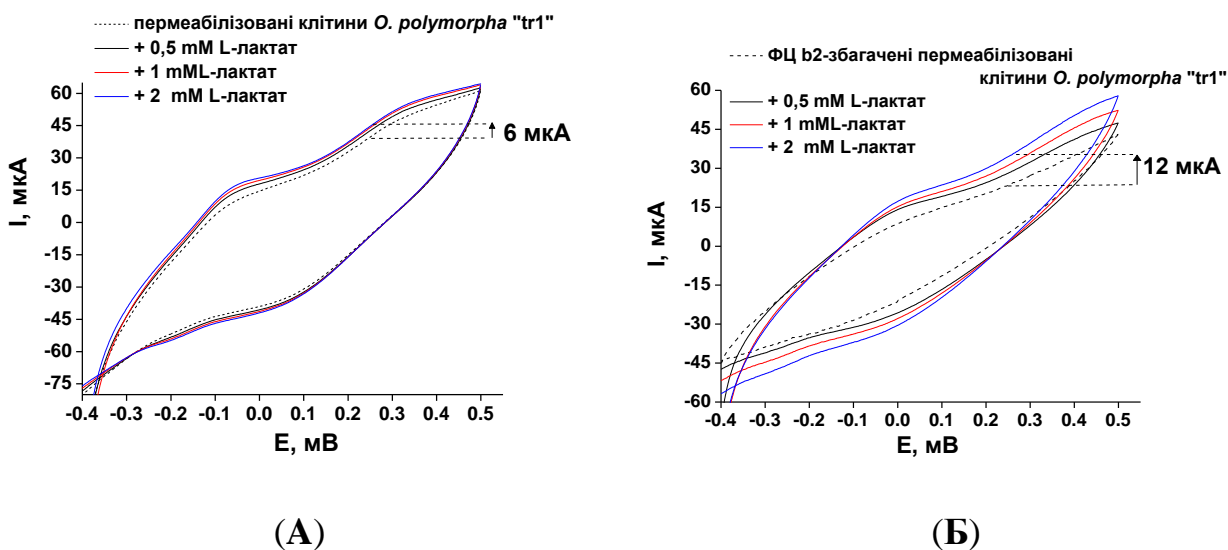


Рис. 3.76. Циклічні вольтамперограми мікробних L-лактат-селективних біоелектродів, сконструйованих на основі 3,05 мм карбонових електродів, модифікованих незбагаченими (А) і ФЦ  $b_2$ -Au-НЧ збагаченими (Б) пермеабілізованими клітинами *O. polymorpha* «tr1», на внесення зростаючих концентрацій L-лактату. Умови: межі сканування - від 0,4 до 0,6 мВ проти Ag/AgCl електроду порівняння; швидкість сканування  $7 \text{ мВ} \cdot \text{с}^{-1}$  у 50 мМ фосфатному буфері, рН 7,8.

Як показано на рисунку 3.76, для біоелектроду, що базується на використанні ФЦ  $b_2$ -Au-НЧ-збагачених клітин, у порівнянні з контрольним біоелектродом (пермеабілізовані клітини дріжджів) спостерігається вдвічі вища

величина відгуку (сила струму) на внесення L-лактату. Як оптимальний робочий потенціал окислення ФМС вибрано потенціал +250 мВ проти Ag/AgCl електроду порівняння. Сигнал для 3,5 мМ L-лактату складав 12 мкА для ФЦ  $b_2$ -Au-НЧ-збагачених клітин і 6 мкА - для контрольних клітин, відповідно.

Хроноамперометричну характеристику біоелектродів на основі різних типів біорозпізнаючих клітинних елементів представлено на Рис. 3.77.

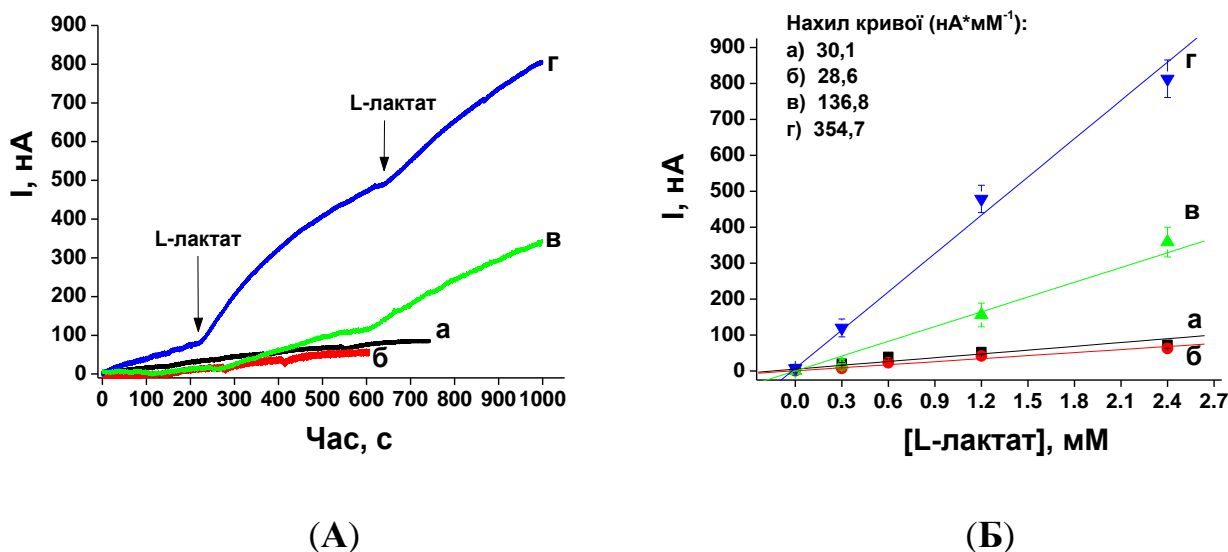


Рис. 3.77. Хроноамперометричні криві відгуку (А) L-лактат-селективних біоелектродів, модифікованих збагаченими ФЦ  $b_2$ -Au-НЧ пермеабілізованими клітинами *O. polymorpha* «tr1», у порівнянні з контрольними біоелектродами: а) інтактні клітини дріжджів; б) Au-НЧ-модифіковані клітини дріжджів; в) пермеабілізовні клітини дріжджів; г) ФЦ  $b_2$ -Au-НЧ-збагачені пермеабілізовні клітини. Калібрувальні криві відгуку біоелектродів (Б) на внесення зростаючих концентрацій L-лактату. Умови: робочий потенціал +250 мВ проти Ag/AgCl електроду порівняння, у 50мМ фосфатному буфері, рН 7,8 при постійному перемішуванні.

Найвища чутливість була досягнута для біоелектродів на основі ФЦ  $b_2$ -Au-НЧ-збагачених пермеабілізовних 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 ( $18,7 \text{ A}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ). Контрольні біоелектроди на основі інтактних клітин дріжджів показали значно нижчу чутливість ( $4,1 \text{ A}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ). Досить близьке значення чутливості було отримано і для інших біоелектродів, сконструйованих з використанням Au-НЧ-модифікованих непермеабілізованих клітин дріжджів ( $3,9 \text{ A}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ). Ця незначна різниця в чутливості свідчить про відсутність впливу нефункціоналізованих наночастинок золота на відгук біоелектродів. 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-НЧ-збагачених пермеабілізованих клітин *O. polymorpha* «tr1» чітко демонструє, що для створення мікробних біосенсорів із поліпшеними біоаналітичними характеристиками можна використовувати запропонований нами підхід збагачення клітин цільовим ферментом, іммобілізованим на наночастиці.

### **3.6.3. Використання очищених препаратів ФЦ $b_2$ для розробки нових методів амперометричного аналізу**

#### **3.6.3.1. Використання ФЦ $b_2$ для візуалізації локальної ензиматичної активності при сканувальній електрохімічній мікроскопії (SECM)**

Візуалізація локальної ферментативної окисно-відновної електроактивності за допомогою скануючої електрохімічної мікроскопії (SECM) забезпечується двома класичними підходами: перший - ферментно-опосередкований з використанням медіаторів електронного переносу (коротка назва - режим зворотного зв'язку, FB), другий - метод генерації зразком електроактивних

продуктів та їх амперометрична детекція електродом (коротка назва - GC) (Рис. 3.78).

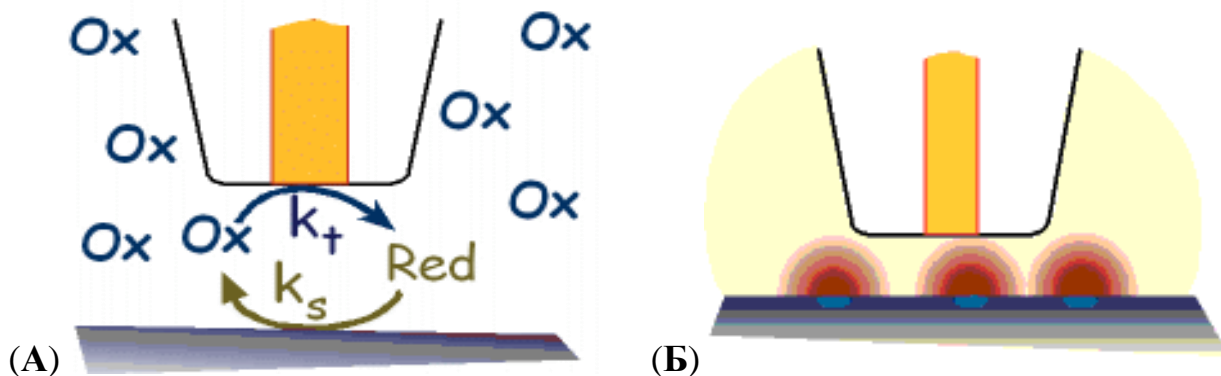


Рис. 3.78. Схематичне зображення методів візуалізації локальної ферментативної окисно-відновної електроактивності в SECM-аналізі: (А) FB; (Б) GC.

Метод FB ґрунтується на окисленні медіатора, відновленого внаслідок ферментативної реакції, на поверхні робочого електроду при відповідному робочому потенціалі. Процес окислення медіатора підвищує величину струму на електроді над ділянкою з активним ферментом у порівнянні з амперометричним сигналом електроду, розташованого над областю без ферментативної активності [227]. На відміну від FB, метод GC не передбачає регенерації медіатора, і редокс-активний продукт ферментативної реакції виявляється безпосередньо на робочому електроді [228, 229]. Однак описані підходи не є досконалими через обмежену чутливість у випадку FB і низьку роздільну здатність для GC. Чутливість FB обмежена внаслідок утрудненої дифузії окисленого медіатора від зони іммобілізованого фермента до поверхні електроду. Незважаючи на високу чутливість GC, він володіє низькою роздільною здатністю в результаті дифузійного зменшення концентрації субстрату навколо ділянки з наявним ферментом.

Нами запропоновано новий високочутливий метод візуалізації локальної ензиматичної активності для SECM-аналізу, що базується на субстрат-залежній конкуренції (ЕС) між ферментом, іммобілізованим у сканувальному зразку, і тим же ферментом, наявним на робочій поверхні мікроелектроду. На відміну від описаних вище SECM-методів, запропонований підхід ферментативної конкуренції демонструє високу чутливість і хорошу якість візуалізації каталітичної активності сканованого зразка.

Як модельний фермент при розробці ЕС для SECM було використано очищений ФЦ  $b_2$  із рекомбінантних клітин *O. polymorpha* "tr1". У дріжджових клітинах, ФЦ  $b_2$  каталізує окислення L-лактату до пірувату з перенесенням електронів з L-лактату через ФМН, як первинний акцептор електронів, на гем і на цитохром  $c$ , як кінцевий акцептор електронів. Окрім природного акцептора (цитохрому  $c$ ), для перенесення електронів з відновленої форми ФЦ  $b_2$  може бути використано низка низькомолекулярних окисно-відновних медіаторів [131, 217]. Для прикладу, ФМС успішно використовується як вільно дифундуючий медіатор переносу електронів з відновленого ФЦ  $b_2$  до поверхні робочого електроду [131, 183, 230]. 0,1 мМ ФМС було використано в нашій роботі для візуалізації локальної ферментативної активності за допомогою SECM.

На первинних етапах дослідження, було проведено оптимізацію умов іммобілізації ФЦ  $b_2$  на поверхні платинового мікроелектроду діаметром 25 мкм. Показано, що найефективнішим методом іммобілізації ферменту є його співосадження в шарі електроосадженого катодного полімеру CP9. Для підтвердження можливості іммобілізації ферменту на поверхні мікроелектроду, проведено дослідження сформованих мікробіоелектродів методом циклічної вольтамперометрії (Рис. 3.79).

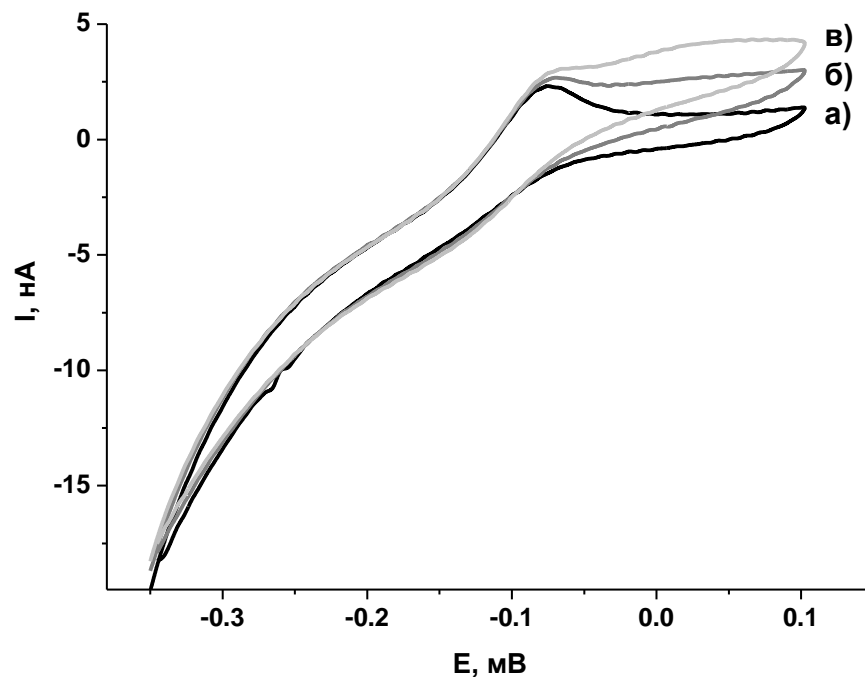


Рис. 3.79. Циклічна вольтамперограма платиного мікроелектроду ( $\varnothing = 25$  мкм) з іммобілізованим ФЦ  $b_2$  без внесення (а), у присутності 1 мМ (б) і 2 мМ L-лактату (в). Умови: швидкість сканування  $7 \text{ мВ} \cdot \text{с}^{-1}$  проти Ag/AgCl у 50 мМ ФБ, рН 7,8 і 0,1 мМ ФМС.

Вольтамперограма платиного мікроелектроду з іммобілізованим ФЦ  $b_2$  свідчить, що внесення зростаючих концентрацій L-лактату посилює пік окислення на електроді в межах  $-100 - 100$  мВ, що відповідає ферментативному окисленню L-лактату. Для детекції електрохімічного окислення ФМС на поверхні мікроелектроду було вибрано робочий потенціал  $-50$  мВ проти Ag/AgCl електроду порівняння.

Принцип запропонованого ЕС-SECM-методу базується на субстрат-залежній конкуренції між ФЦ  $b_2$ , іммобілізованим на поверхні мікроелектроду, та тим же ферментом, наявним на склоподібній вуглецевій пластинці (підкладці) (Рис. 3.80).

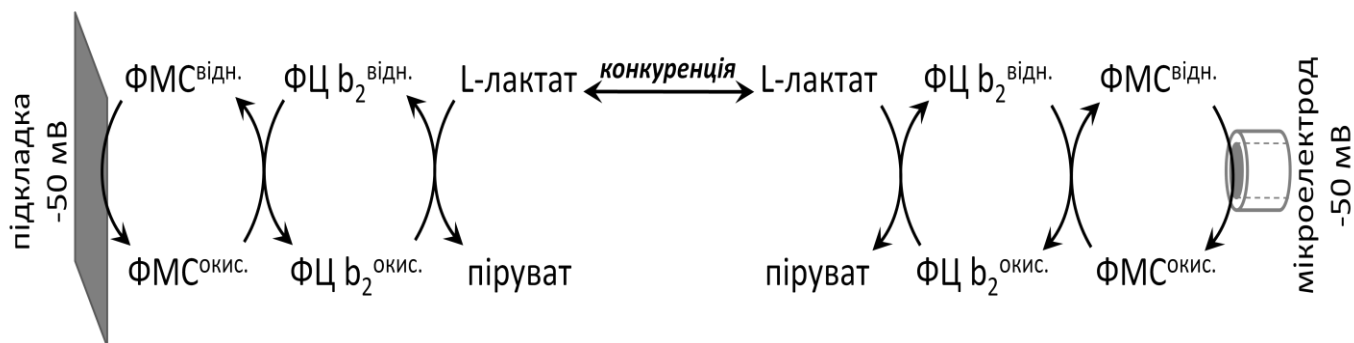


Рис. 3.80. Схематичне зображення шляхів перенесення електронів у ЕС при візуалізації локальної ензиматичної активності ФЦ  $b_2$  у SECM-аналізі.

Слід зазначити, що покриття поверхні мікроелектроду шаром біоплівки (сформованої ферментом та полімером) ускладнює точне визначення відстані електроду (його позиціонування) відносно підкладки під час підготовки сканування. Швидкість дифузії окисно-відновного медіатора в полімерному шарі повільніший, ніж у розчині, і фарадичний струм для медіатора на поверхні мікроелектроду може бути обмежений. З цієї причини пропонується використовувати ультратонкі плівки полімерних матриць і повільне, плавне позиціонування мікробіоелектроду відносно сканувальної підкладки.

З метою з'ясування топографії сканованого зразка (ділянки підкладки з іммобілізованим ферментом) візуалізація SECM проводилася з використанням немодифікованого безензимного мікробіоелектроду (голого електроду) і кисневого GC-методу (Рис. 3.81).

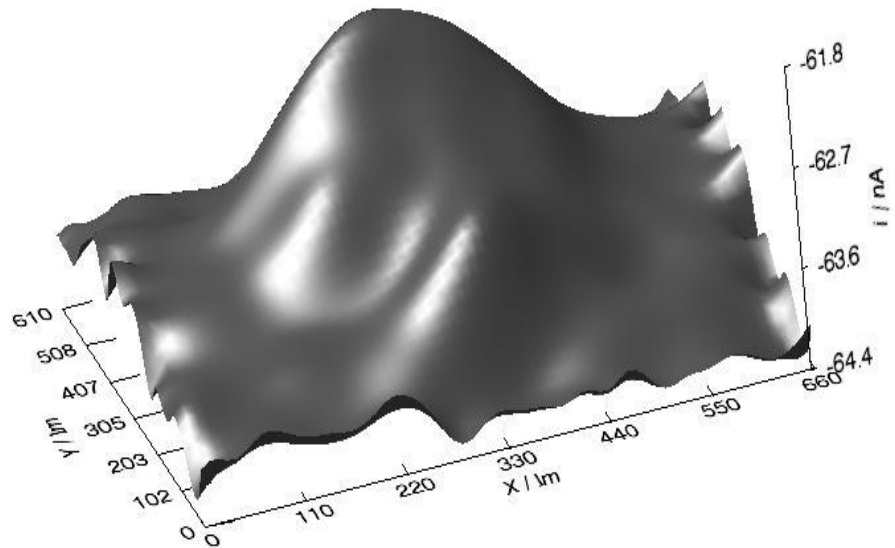


Рис. 3.81. Топографічне SECM-зображення ділянки підкладки з іммобілізованим ФЦ  $b_2$  на підкладці в 50 мМ ФБ, рН 7,8. Умови: постійний потенціал прикладений до підкладки 0 мВ проти Ag/AgCl; профіль робочих потенціалів мікроелектроду 0 мВ (0,5 с), 650 мВ (0,4 с) проти Ag/AgCl електроду порівняння.

Топографічне 3D-зображення SECM дає змогу оцінити розміри та структуру ділянки підкладки з наявним (іммобілізованим) ферментом.

Типові SECM-зображення локальної ензиматичної активності ділянки підкладки з іммобілізованим ФЦ  $b_2$  розробленим ЕС-підходом представлено на Рис. 3.82.

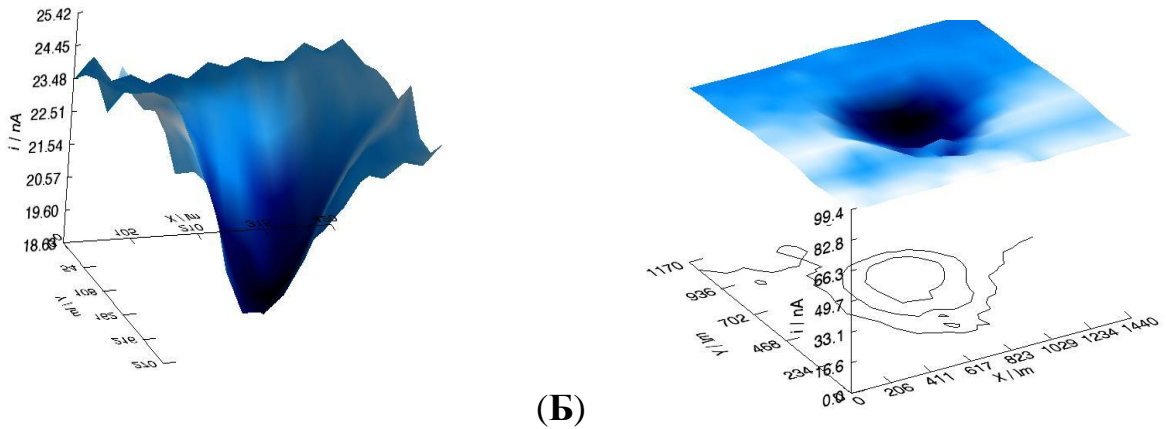


Рис. 3.82. (А) SECM-зображення локальної ензиматичної активності на ділянці підкладки з іммобілізованим ФЦ  $b_2$  за допомогою ЕС-підходу. (Б) Профіль зон із різною ензиматичною активністю ділянки підкладки з іммобілізованим ФЦ  $b_2$ . Умови: постійний потенціал, прикладений до підкладки,  $-50$  мВ проти  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ; схема робочих потенціалів мікроелектроду:  $250$  мВ ( $0,5$  с),  $-50$  мВ ( $0,4$  с) проти  $\text{Ag} / \text{AgCl}$  електроду порівняння.

Під час переміщення над сканованою поверхнею ензимний мікроелектрод створює 3D-картину локального зменшення концентрації L-лактату за рахунок його розщеплення ФЦ  $b_2$ . Найвища локальна ензиматична активність ділянки підкладки з іммобілізованим ФЦ  $b_2$  відповідає більшій величині амперометричного сигналу та темнішому забарвленню SECM-зображення, тоді як світла ділянка відповідає базовому сигналу підкладки за межами ділянки з іммобілізованим ферментом. Окрім того, розроблений ЕС для SECM дає змогу оцінити профіль зон зразку із різною ензиматичною активністю всередині ділянки з іммобілізованим ФЦ  $b_2$  (Рис. 3.82, Б).

Для оцінки чутливості розробленого ЕС-підходу, результати дослідження з його використанням порівнювались із результатами візуалізації класичним методом FB (Рис. 3.83).

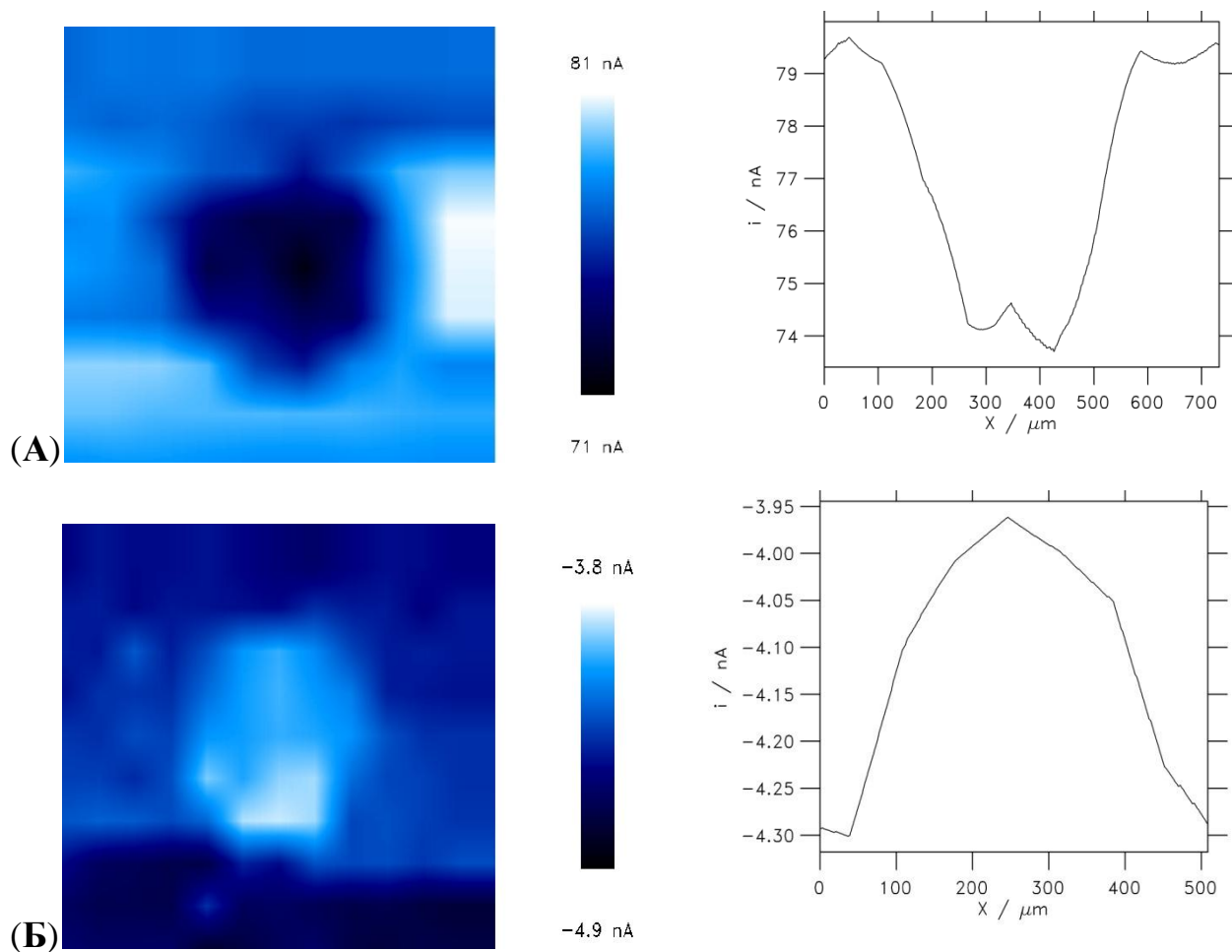


Рис. 3.83. А) SECM-зображення (зліва) та профіль амперометричного сигналу підкладки з іммобілізованим ФЦ  $b_2$  (справа), отримані за використання ЕС-підходу. Б) SECM-зображення тієї ж ділянки підкладки (зліва) та профіль амперометричного сигналу (справа), отримані за використання FB. Умови: постійний потенціал, прикладений до підкладки  $-50$  мВ проти Ag/AgCl; схема робочих потенціалів мікроелектроду:  $-250$  мВ (0,5 с),  $-50$  мВ (0,4 с) проти Ag/AgCl електроду порівняння.

Із Рис. 3.83 випливає, що при візуалізації локальної ензиматичної активності ФЦ  $b_2$  чутливість ЕС-підходу є на порядок вища у порівнянні із класичним FB-методом. Так, профіль амперометричного сигналу підкладки з іммобілізованим ФЦ  $b_2$  при ЕС демонструє величину відгуку на рівні  $10$  нА



(Рис. 3.83, А), тоді як при використанні ФВ при скануванні тієї ж ділянки підкладки величина амперметричного сигналу не перевищує 1 нА (Рис. 3.83, Б).

Розроблений ЕС було використано для амперметричного аналізу L-лактату (Рис. 3.84).

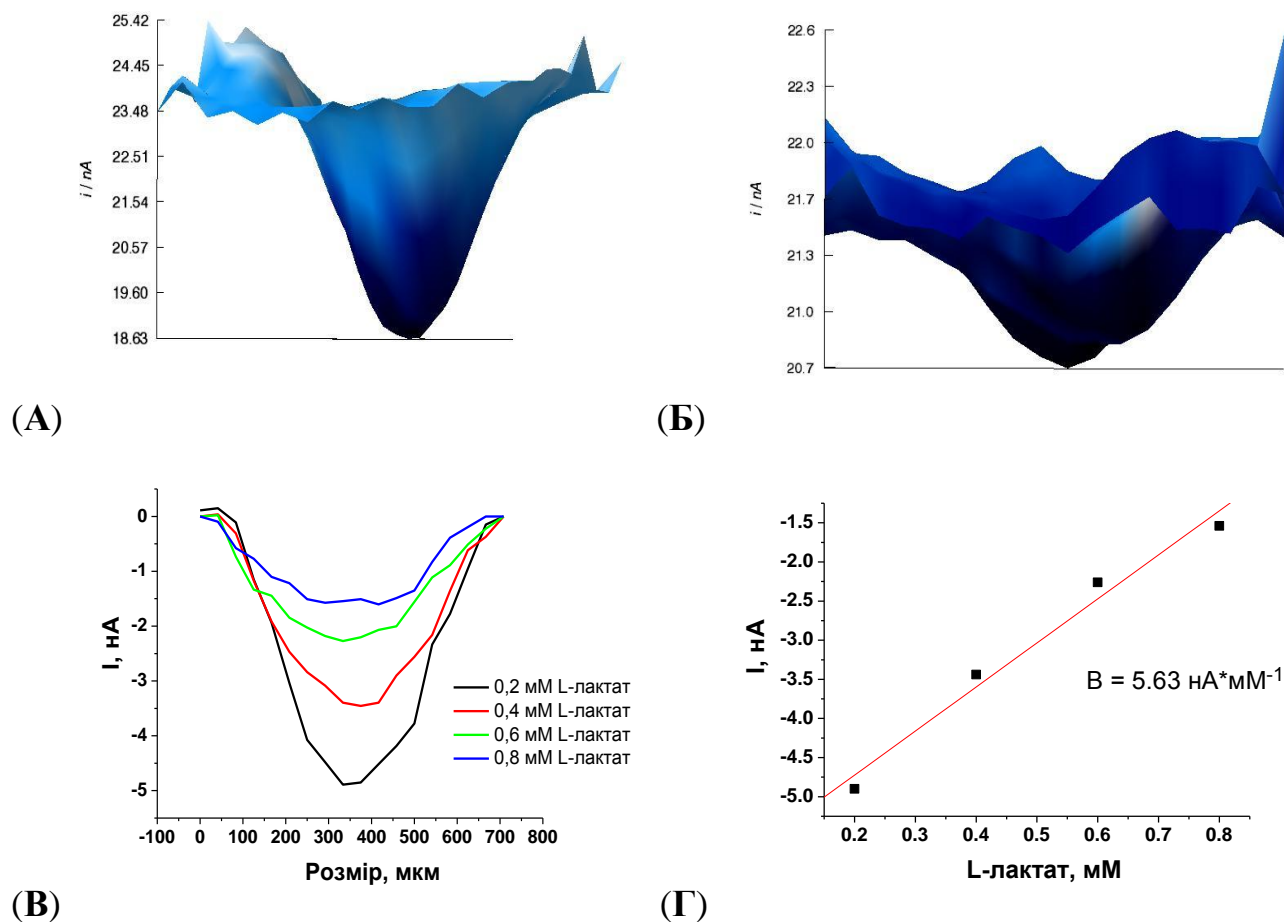


Рис. 3.84. А) SECM-зображення локальної активності підкладки з іммобілізованим ФЦ  $b_2$  при внесенні 0,2 мМ (зліва) та після додавання 0,8 мМ L-лактату (справа), отримані за використання ЕС-підходу. Б) SECM-профіль амперметричної відповіді підкладки з іммобілізованим ФЦ  $b_2$  на внесення зростаючих концентрацій L-лактату. В) Калібрувальна крива отримана SECM-ЕС підходом.

Як показано на Рис. 3.84, запропонований ЕС-підхід характеризується високою чутливістю і хорошою якістю зображення. Висока чутливість ЕС ( $36,1 \text{ A}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{M}^{-2}$ ) забезпечується безперервною регенерацією медіатора всередині досліджуваного зразка (ФЦ  $b_2$ , утримуваного *CP9*) і не залежить від рівня дифузії окисленого медіатора ззовні. Однак, якість цього режиму надзвичайно залежить від характеристик мікроелектроду і розміру сканованого зразка. Довжина мікроелектроду повинна бути не менше 0,5 см, а RG - близько 4 (RG - відношення діаметра мікроелектроду до діаметра платинового дроту). Якщо мікроелектрод затовстий, під час руху він може зміщувати зразок в напрямку руху. З іншого боку, діаметр сканованого зразка не повинен перевищувати 400-500 мкм, оскільки це дозволяє досліджувати меншу площу з вищою роздільною здатністю.

Розроблений ЕС-підхід для SECM-візуалізації локальної окисно-відновної електроактивності ФЦ  $b_2$  може бути використано як для кількісного аналізу L-лактату, так і для характеристики поверхні біоселективного елементу при конструюванні ензимних амперометричних біосенсорів.

### **3.6.3.2. Конструювання безмедіаторних ензимних біосенсорів на L-лактат на основі ФЦ $b_2$ та наночастинок золота, іммобілізованих на графітових електродах**

Для створення безмедіаторного ензимного біосенсора нами використано здатність відновленого ФЦ  $b_2$  до прямого перенесення електронів на поверхню робочого електроду [217]. 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 [217].

Нами висунуто припущення, що модифікація робочого електроду наночастинками (наносхаром) золота значним чином підвищить ефективність прямого перенесення електронів із ФЦ  $b_2$ .

У ролі носіїв для іммобілізації флавоцитохрому  $b_2$  (ФЦ  $b_2$ ) використано золоті наночастинки, отримані методом відновлення Au(III) із розчину  $\text{HAuCl}_4$  *in situ*. Відновлюючим агентом служив 30 % пероксид водню [172]. Відновлення золота (III) пероксидом здійснювали безпосередньо на поверхні 3 мм графітового електроду. Перед формуванням наносхару золота, робочу поверхню графітових електродів зачищали на наждачному папері та полірували, використовуючи фільтрувальний папір.

Електрохімічні властивості електродів із нанопокриттям золота (Au-НЧ) досліджували за допомогою циклічної вольтамперометрії на базі стандартного амперометричного потенціостату *CHI 1200A* (IJ Cambria Scientific Ltd, Порт Барі, Великобританія) за використання трьохелектродної сенсорної конфігурації: срібло-хлорсрібний  $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$  (3 M) використовували як електрод порівняння, як допоміжний використовували стержневий платиновий електрод (Рис. 3.85).

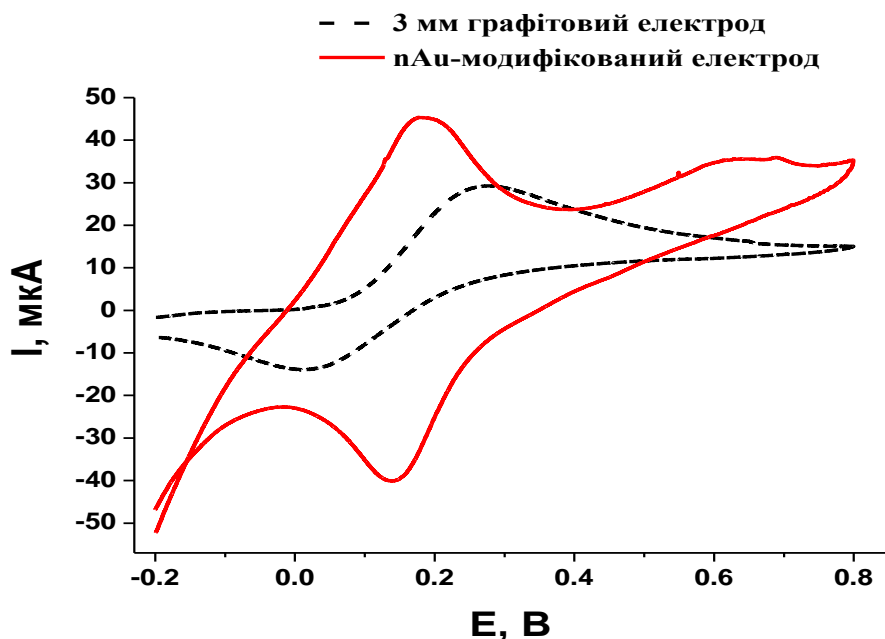


Рис. 3.85. Циклічна вольтамограма Au-НЧ-модифікованого графітового електроду. Наночастинки золота (Au-НЧ) отримано відновленням  $\text{H}_2\text{O}_2$ , швидкість сканування  $50 \text{ мВ с}^{-1}$  проти  $\text{Ag}/\text{AgCl}/3 \text{ М КCl}$ ,  $20 \text{ мМ}$  фосфатний буфер,  $\text{pH } 7,5$ .

Як видно із Рис. 3.85, модифікація електроду наночастинами золота в значній мірі покращує електропровідність 3 мм графітового електроду.

Для дослідження можливого позитивного впливу нанопокриття золота на прямий (безмедіаторний) перенос електронів від відновленого ФЦ  $b_2$  на поверхню робочого електроду було сформовано біоселективну мембрану з використанням комерційного катодного полімера GY 83-0270 0005 (BASF Farben und Lacke, Мюнстер, Німеччина) в ролі іммобілізуючого агенту. Іммобілізацію проводили за наступною схемою: 2-4 мкл ФЦ  $b_2$  з активністю  $14\text{-}19 \text{ од}\cdot\text{мл}^{-1}$  наносили крапельним шляхом на поверхню електроду. Поверх суспензії ферменту вносили 8 мкл розведеного в 10 разів катодного полімеру (GY 83-0270

005; рН 5,5). При цьому відбувалась преципітація полімеру і формувалась міцна полімерна плівка [217].

Дослідження проводили за допомогою циклічної вольтамперометрії зі швидкістю сканування  $7 \text{ мВ с}^{-1}$  на безмедіаторних ензимних біоселективних мембранах, сформованих на поверхні Au-НЧ, у порівнянні із контрольним дослідом для фермента, іммобілізованого на графіті без використання нанопокриття (Рис. 3.86).

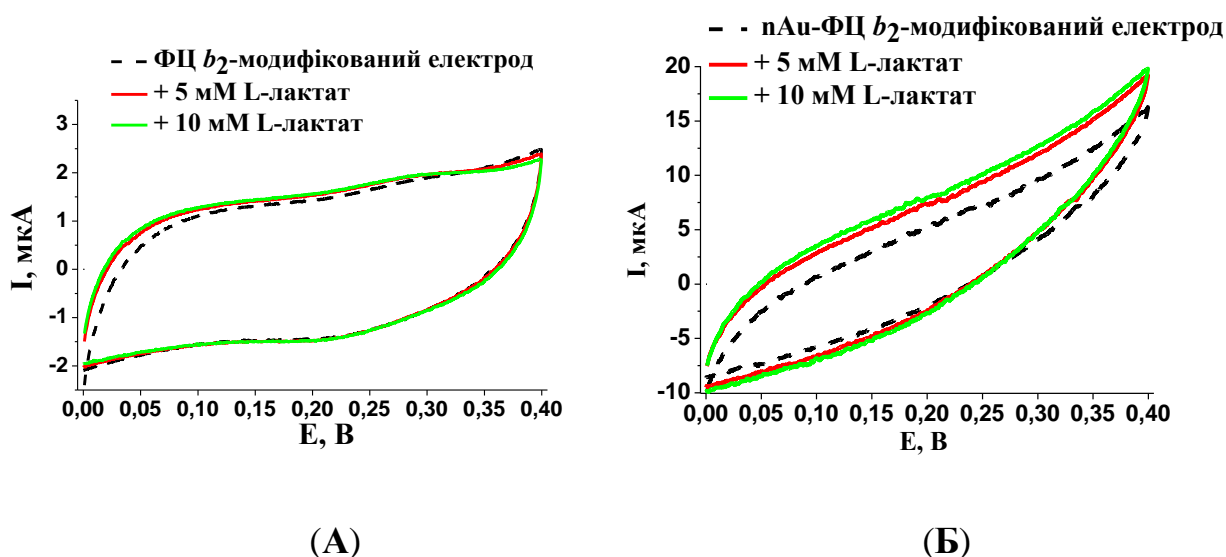


Рис. 3.86. Циклічна вольтамограма ФЦ  $b_2$ -модифікованих електродів за відсутності медіатора. (А) ФЦ  $b_2$ -модифікований графітовий електрод (контроль). (Б) ФЦ  $b_2$ -Au-НЧ-модифікований електрод. Умови: швидкість сканування  $7 \text{ мВ с}^{-1}$  проти Ag/AgCl/3 М КCl, 20 мМ фосфатний буфер рН 7,5.

Як показали попередні дослідження, відгук ФЦ  $b_2$ -модифікованого графітового електроду на 5 мМ L-лактат при +250 мВ (величина потенціалу при якій спостерігається пряме окислення відновленого ФЦ  $b_2$  на поверхні електроду) був рівний 0,1 мкА, тоді як ензимний електрод, попередньо модифікований наночаром золота, продемонстрував максимальний струм на рівні 2,25 мкА.

Таким чином, використання нанос шару золота забезпечило підвищення чутливості амперометричного сигналу більш ніж 22 рази у порівнянні із біоелектродом без використання Au-НЧ (Рис. 3.87).

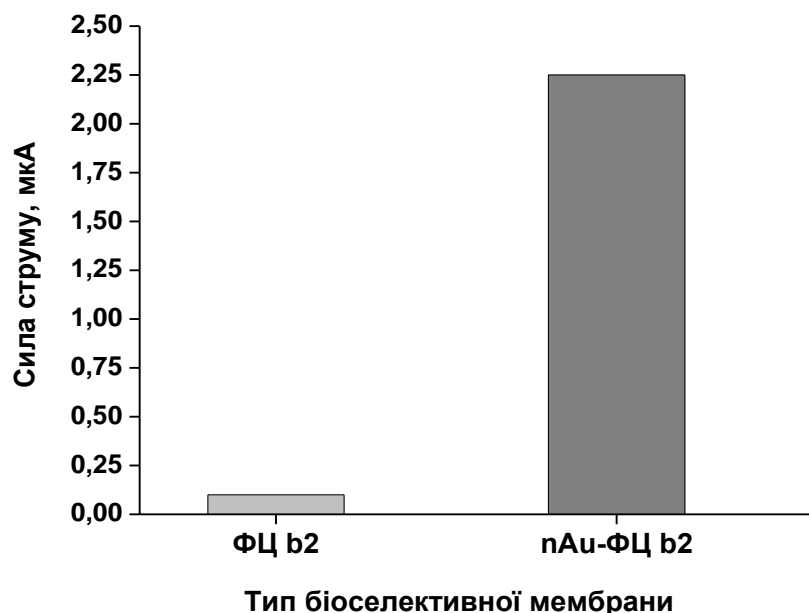


Рис. 3.87. Порівняння величини амперометричного відгуку при безмедіаторному (прямому) перенесенні електронів для ФЦ  $b_2$ , іммобілізованого на графіті, та ФЦ  $b_2$ , нанесеного на нанос шар золота (Au-НЧ). Наведено дані для типового експерименту.

### 3.6.3.3. Створення прототипу L-лактат-селективного біосенсора “третього покоління” на основі ФЦ $b_2$ , іммобілізованого на поверхні золотого електроду, модифікованого наночастинками золота

При конструюванні прототипу лактат-селективного біосенсора “третього покоління” на основі ФЦ  $b_2$ , нанос шар золота формували на поверхні комерційного 4 мм золотого електроду C220 («DropSens» Ріверв’ю, Флорида,

США) шляхом відновлення іонів золота(III) 30 % пероксидом водню (див. розділ 2.5.2). Для прискорення відновлення золота(III), керамічну основу електроду підігрівали протягом 20-30 с на полум'ї запальнички (газового пальника). Характеристика електропровідності модифікованого наночаром золотого електроду порівнювалась із немодифікованим золотим електродом (Рис. 3.88).

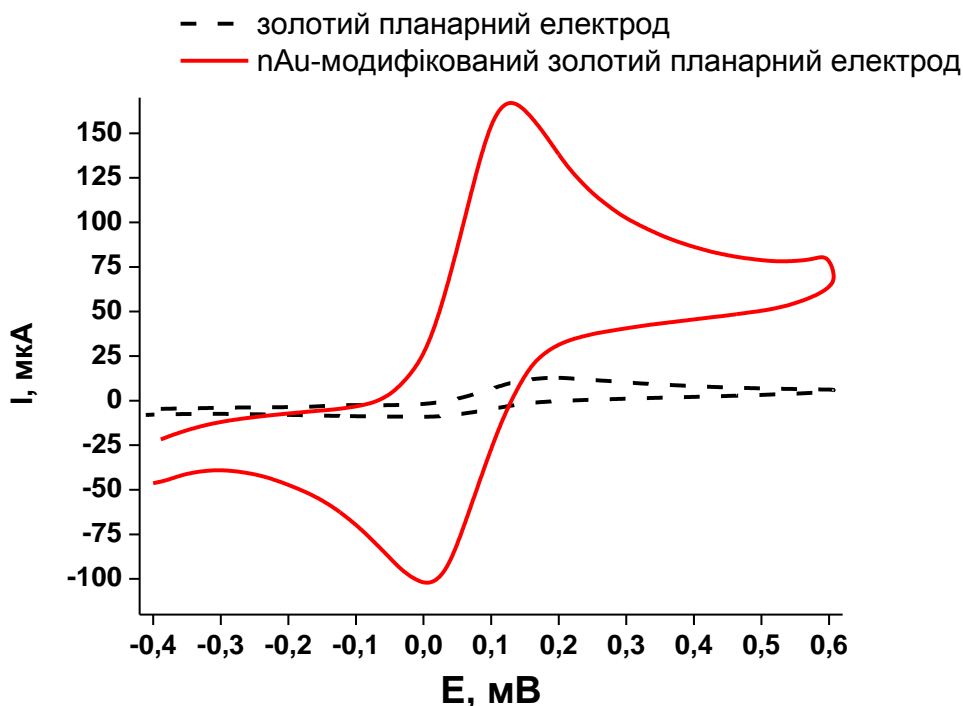


Рис. 3.88. Циклічна вольтамограма Au-НЧ-модифікованого золотого планарного електроду. Наночастинки золота отримано відновленням  $\text{H}_2\text{O}_2$ , швидкість сканування  $50 \text{ мВ с}^{-1}$  у  $20 \text{ мМ}$  у розчині електроліту:  $10 \text{ мМ } \text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] / 100 \text{ мМ } \text{KCl}$ .

Як видно із наведених даних, модифікація золотих планарних електродів наночаром золота значним чином підвищує електропровідність робочого електроду (у 18 разів). У порівнянні із Au-НЧ-модифікованими графітовими

електродами (див. Рис. 3.87), електропровідність Au-НЧ-модифікованих золотих електродів є вищою у понад 3 рази.

Для підтвердження утворення наночару золота на поверхні комерційного електроду було проведено дослідження його поверхні за допомогою сканувальної електронної мікроскопії на растровому електронному мікроскопі-мікроаналізаторі РЕММА-102-02 (Рис. 3.89).

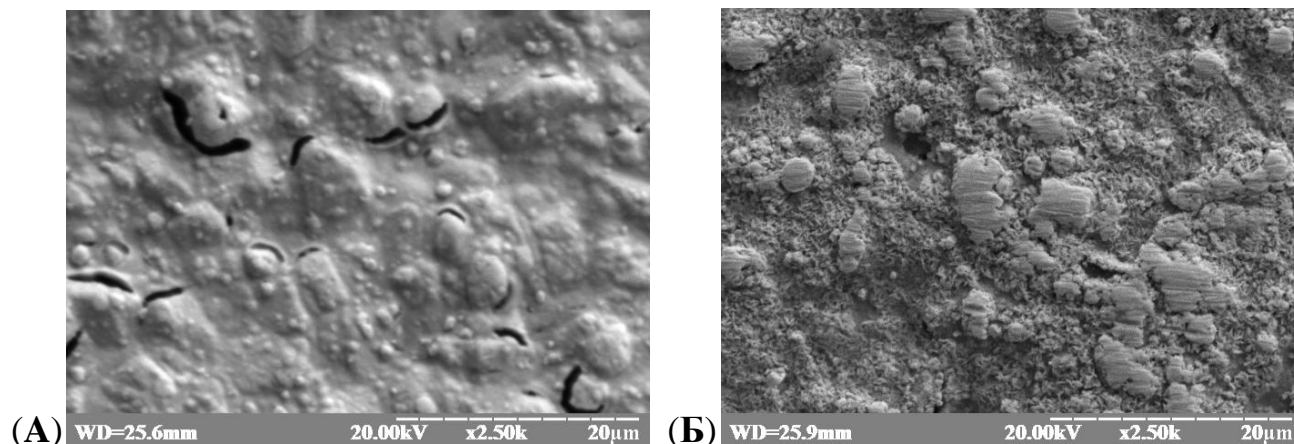


Рис. 3.89. Сканувальна електронна мікроскопія поверхні золотого планарного 4 мм золотого електроду C220 «DropSens» (А), та ж поверхня після модифікації наночаром золота (Б). *Примітка:* WD – відстань від останньої лінзи мікроскопа до проби (мм); kV – прискорююча напруга (eV); x2.5k – 2500-кратне збільшення; 20 µm – масштабна одиниця.

Як видно із результатів досліджень, є чіткі відмінності у структурі поверхні немодифікованого та модифікованого наночаром золота електродів. Внаслідок формування Au-НЧ-шару поверхня електроду стає мікрористалічною з наявністю як кластерів неправильної форми, так і пучків мікрофібрилярних структур (Рис. 3.89, Б). Рентгеноспектральний аналіз також підтвердив формування наночару золота на поверхні комерційного золотого електроду (Рис. 3.90).



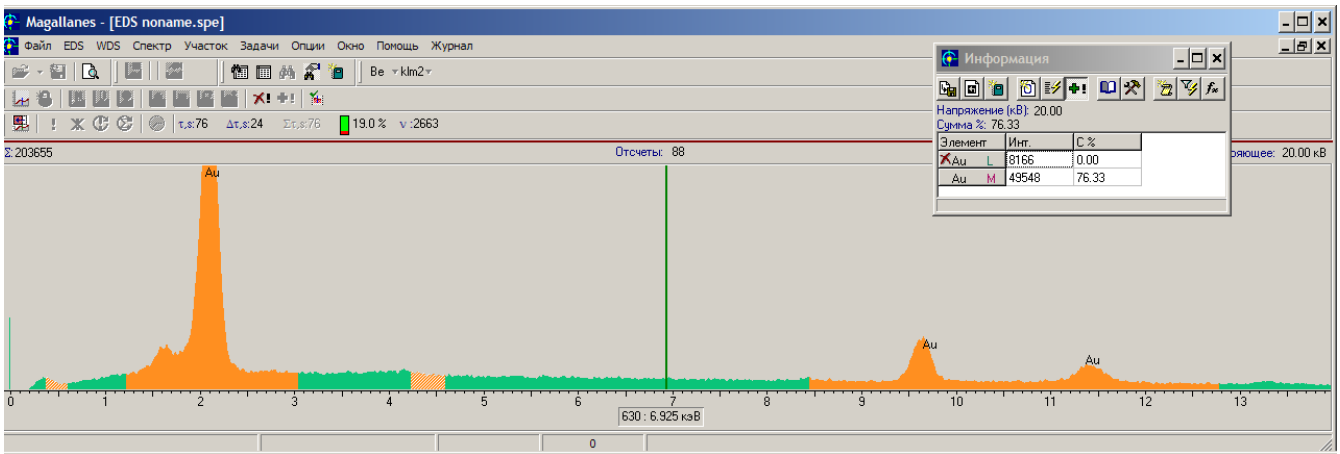


Рис. 3.90. Рентгеноспектральний аналіз поверхні золотого планарного електроду *C220* модифікованого наносаром золота.

Окрім покращення електропровідності робочих електродів за рахунок збільшення електроактивної поверхні, наносар золота може здійснювати пряме перенесення електронів від моношару ферменту за рахунок „правильної орієнтації” гемової ділянки ферменту відносно електроду (Рис. 3.91).

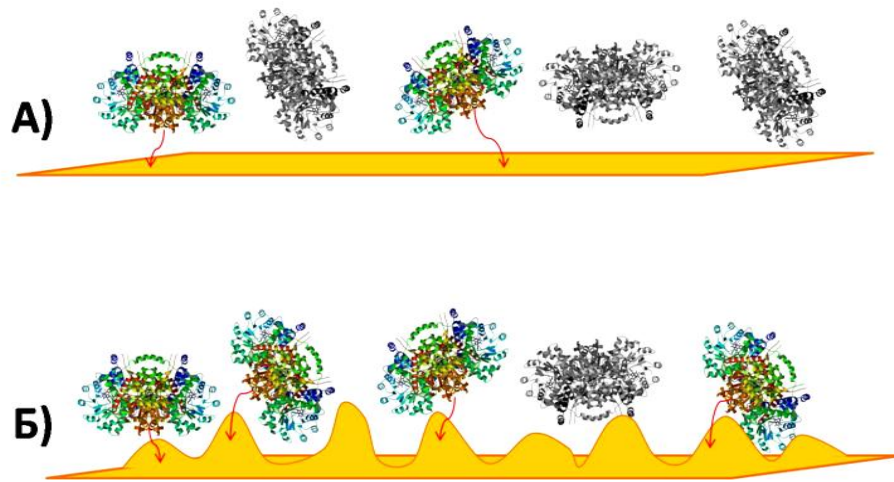


Рис. 3.91. Схематичне зображення прямого перенесення електронів із відновленого ФЦ  $b_2$  на поверхню золотого (А) та Au-НЧ-модифікованого золотого (Б) планарних електродів. Кольорове зображення – молекули ФЦ  $b_2$ , що забезпечують пряме перенесення електронів, чорно-біле зображення – молекули ферменту, що не беруть участі в цьому процесі.

Детальніше дослідження фізико-хімічних характеристик модифікованих нанозолотом L-лактат-селективних електродів проводилось за допомогою хроноамперометричного аналізу при кімнатній температурі в скляній комірці об'ємом 50 мл, заповненій 25 мл фосфатного буферу, рН 7,6. Біоелектроди поміщали в інтенсивно перемішуваний розчин і, після встановлення базового сигналу при робочому потенціалі 250 мВ, в комірку вносили зростаючі концентрації L-лактату.

За допомогою експериментальних зразків потенціостатів „Postat-16” та „Biosens” (розроблених у співпраці із Ю.Г. Дубовим у рамках науково-технічного проекту «Розробка і виготовлення експериментальних зразків електрохімічних біосенсорів для аналізу формальдегіду в харчових продуктах, фармацевтичних препаратах та доквіллі») реєстрували та обробляли результати вимірювань у відносних одиницях зміни величини струму. Хроноамперометричні дослідження проводились на ензимних біоселективних мембранах, сформованих на поверхні Au-НЧ (Рис. 3.92), у порівнянні із контрольним дослідом без використання нанопокриття (Рис. 3.93).

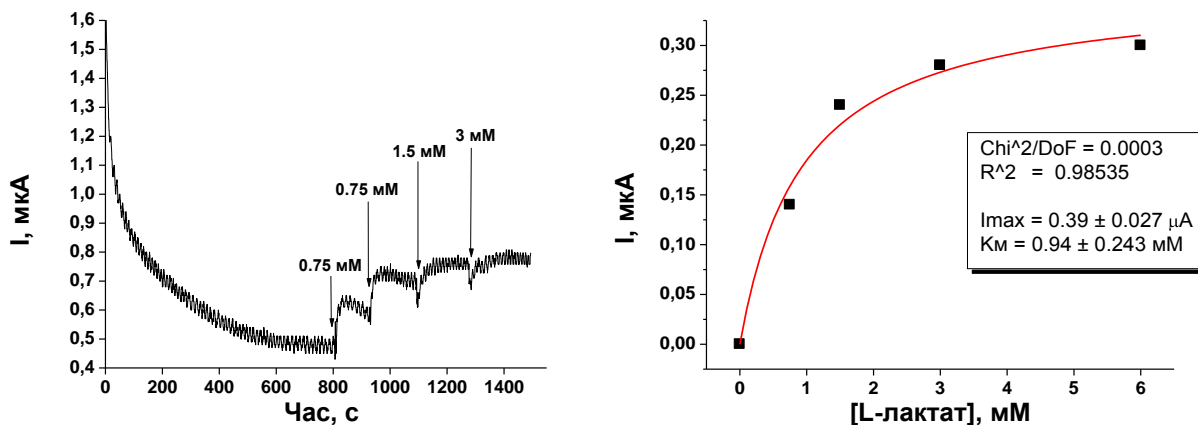


Рис. 3.2. Хроноамперограма (ліворуч) та калібрувальна крива (праворуч) для 4 мм золотого планарного електроду, модифікованого ФЦ  $b_2$ . Наведено дані для типового експерименту.

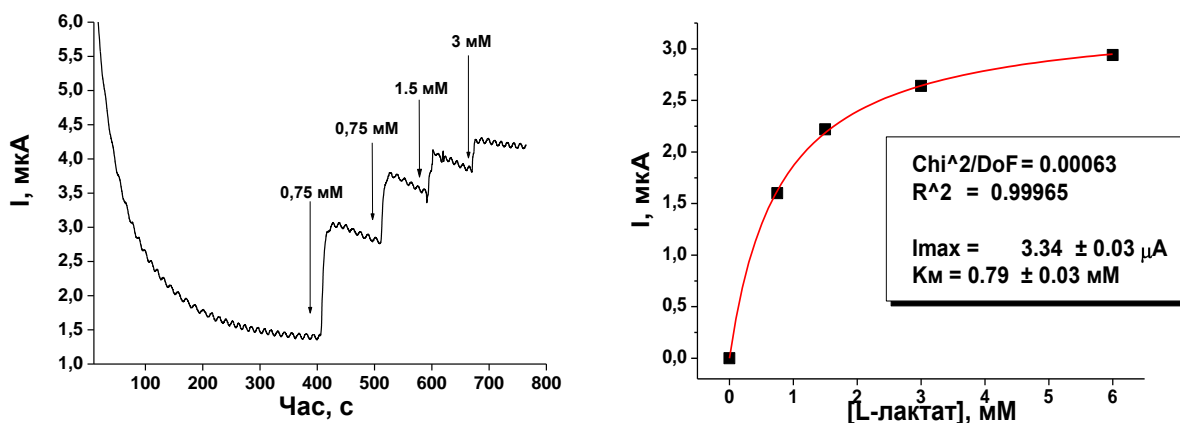


Рис. 3.93. Хроноамперограма (ліворуч) та калібрувальна крива (праворуч) для 4 мм золотого планарного електроду, модифікованого наночаром золота та ФЦ  $b_2$ . Наведено дані для типового експерименту.

Досліджено деякі фізико-хімічні характеристики розроблених амперометричних біоелектродів “третього покоління”, селективних до L-лактату. Для порівняння, максимальна величина відгуку ФЦ  $b_2$ -модифікованих традиційних електродів становить  $0,39 \pm 0,027$  мкА (площа поверхні електроду  $12,6 \text{ мм}^2$ ) (Рис. 3.92), тоді як електрод, модифікований наночаром золота та

ФЦ  $b_2$  демонструє на порядок вищу величину відгуку ( $3,34 \pm 0,03$  мкА) (площа поверхні електроду  $12,6$  мм<sup>2</sup>) (Рис. 3.93). Значення позірної константи Міхаеліса-Ментен ( $K_M$ ) сенсора обраховувалось із отриманих концентраційних залежностей відгуку на L-лактат і становила 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 наночастиною золота та ФЦ  $b_2$ .

Швидкість відгуку сигналу сенсора при прямому перенесенні електронів від електроду, модифікованого наночастиною золота та ФЦ  $b_2$ , характеризується такими параметрами: 50 % сигналу досягається за 4,5 с, а 90 % за 10 секунд (Рис. 3.94).

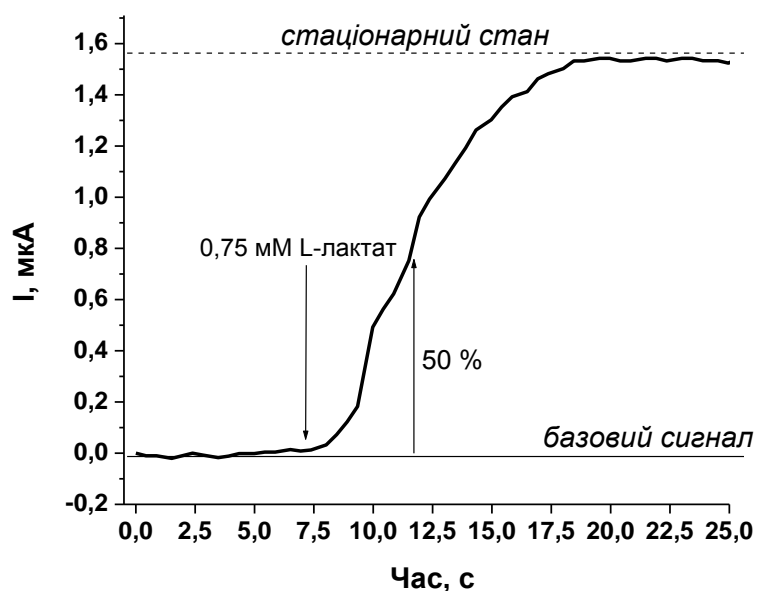


Рис. 3.94. Динаміка розвитку відгуку Au-НЧ-ФЦ  $b_2$ -модифікованого планарного електроду на  $0,75$  мМ L-лактат (робочий потенціал  $250$  мВ,  $20$  мМ фосфатний буфер, рН  $7,2$ ).

Як показали результати проведених досліджень, використання наночастинок золота у порівнянні із варіантом без використання Au-НЧ забезпечує значне

підвищення відгуку сигналу безмедіаторного біосенсора (більш ніж на порядок) і навіть дещо покращує афінність до L-лактату (у 1,2 раза).

Розроблений прототип біосенсора «третього покоління» на L-лактат було адаптовано для використання у складі дослідного зразка амперометричного аналізатора «Форматест–2010» [231] (розробленого у співпраці із ТЗОВ „Науково-виробнича фірма „Інженерна Лабораторія” ЛТД (Львів, Україна) в особі директора к.т.н. Вуса Б.С. в рамках комплексної науково-технічної програми: *“Сенсорні системи для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб: метрологічне забезпечення та дослідна експлуатація”*) (Рис. 3.95).



Рис. 3.95. Дослідний зразок амперометричного аналізатора «Форматест–2010».

Тестування біосенсорної системи проводили на зразках фармацевтичних препаратів трансфузійного призначення, що містять L-лактат у своєму складі. Дані дослідження проводились на базі відділу біохімії крові ДУ «Інститут

патології крові та трансфузійної медицини НАМН України». Фармацевтичні препарати для тестування були люб'язно надані завідувачом лабораторії технології трансфузійних препаратів цього ж інституту д.м.н., ст.н.сп. Б.О. Кондрацьким.



Рис. 3.96. Фармацевтичні препарати трансфузійного призначення, відібрані для вимірювань вмісту L-лактату.

Результати визначення вмісту L-лактату в зазначених фармацевтичних препаратах трансфузійного призначення наведено у таблиці 3.20.

Результати визначення вмісту L-лактату (мМ) у фармацевтичних препаратах трансфузійного призначення.

Назва препарату	Вказано виробником	NAD <sup>+</sup> -L-ЛДГ метод	Амперометричний аналізатор «Форматест–2010»
“Сорбілакт”	169,55	173,88 ± 2,5	165,5 ± 2,2
“Гекотон”	133,8	139,3±3,4	130,2 ± 1,8
“Реосорбілакт”	169,55	175,44 ± 4,0	164,3 ± 2,0
“Лактоксил”	93,7	97,5 ± 4,2	92,6 ± 1,2
“7 % L/D-Lactate”	625 (сума рацематів)	259,0 ± 14,2	265,7 ± 3,5

Результати визначення L-лактату в фармацевтичних препаратах трансфузійного призначення за допомогою амперометричного аналізатора «Форматест–2010» та ензиматичним методом за використання NAD<sup>+</sup>-залежної L-лактатдегідрогенази, як референтним, добре корелюють із величинами, зазначеними виробником: різниця варіює від 1,2 до 3,1 % (для L-лактат-вмісних препаратів) та 7,5 – для рацемату.

#### **3.6.3.4. Вивчення можливості неінвазійного сенсорного моніторингу вмісту лактату в біологічних рідинах людини за допомогою прототипу лактат-селективного біосенсора “третього покоління”**

Нещодавно описано створення та апробацію неінвазивного натільного біосенсорного чіпу для визначення L-лактату в поті при фізичних навантаженнях людини [232]. В основі описаного біоелектроду лежить принцип ензиматичного окислення лактату за дії лактатоксидази із подальшим перенесенням електронів із відновленого ферменту на робочу поверхню електрода за посередництва

медіатора. Основними перевагами описаного біочіпу є можливість онлайн-моніторингу вмісту лактату при різних навантаженнях, широкі межі лінійності (до 20 мМ L-лактату), використання низького робочого потенціалу 50 мВ, гнучкість основи, що знижує незручності при його кріпленні на поверхню шкіри.

Ми поставили за мету створити прототип безмедіаторного біосенсора для неінвазивного кількісного визначення вмісту L-лактату в поті та слині на основі ФЦ  $b_2$ .

Конструювання прототипу L-лактат-селективного біоелектроду для неінвазивного сенсорного аналізу потребувало використання нешкідливих, гіпоалергенних матеріалів. У зв'язку з цим, для забезпечення утримання ФЦ  $b_2$  та вільного проникнення аналіту до поверхні електроду, запропоновано наступну схему формування біоелектроду (Рис. 3.97).



Рис. 3.97. Схема формування (А) та загальний вигляд прототипу L-лактат-селективного біоелектроду для проведення неінвазивного сенсорного аналізу вмісту лактату (Б).

На поверхню Au-НЧ-модифікованого золотого планарного електроду крапельним методом наносили 4 мкл препарату ФЦ  $b_2$  з активністю 24 Од·мл<sup>-1</sup>(визначеною за 30 °С). Після підсихання поверхні електроду (5-7 хв при кімнатній температурі), електрод покривали діалізною мембраною круглої форми, яка забезпечує утримання ферменту на поверхні електроду та вільне



проникнення L-лактату (Рис. 3.97, А). Для фіксації діалізної мембрани на робочій поверхні планарного електроду, використано смужку прозорого скотчу з отвором, що відповідає розміру робочої поверхні електроду (Рис. 3.97). Сконструйований таким чином біоелектрод, зберігали у 10 мМ ФБ, рН 7,8 при +4 °С до початку експлуатації.

Тестування прототипу L-лактат-селективного біоелектрода для прямого аналізу поту *in situ* (на тілі) проводили наступним чином. На поверхню електроду попередньо підключеного до потенціостату при робочому потенціалі 300 мВ, крапельним методом наносили 10 мкл 10 мМ ФБ, рН 7,8 для забезпечення стабілізації сенсорного сигналу. Після стабілізації базового сигналу, за допомогою фільтрувального паперу з поверхні біоелектроду усували буфер, а електрод прикладали до внутрішнього боку долоні. При цьому спостерігали зростання відгуку сенсора за рахунок ензиматичного окислення лактату (Рис. 3.98, зліва).

Прямий аналіз L-лактату в слині проводили шляхом поміщення біоелектроду під язик, після попередньої стабілізації базового сенсорного етапу (див. вище). Як і у випадку із аналізом молочної кислоти в поті, спостерігали динамічний розвиток сенсорного відгуку (Рис. 3.98, справа).

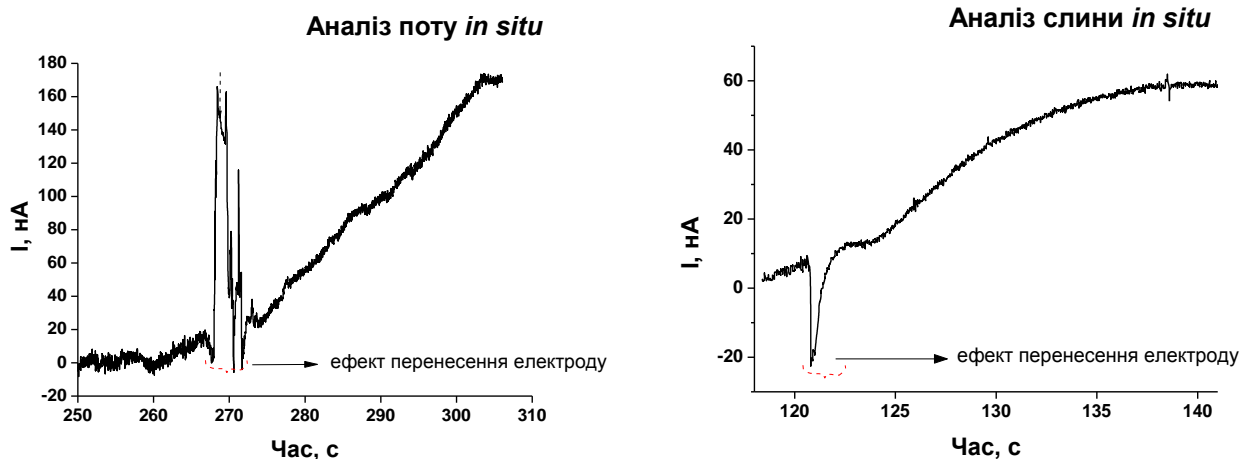


Рис. 3.98. Хроноамперограма прямого визначення L-лактату в поті (зліва) та слині (справа) прототипом L-лактат-селективного біоелектроду.

Із хроноамперограми неінвазивного визначення вмісту L-лактату в поті видно, що сенсорний сигнал після перенесення електроду на досліджувану поверхню за 35 с виріс до значення 170 нА (Рис. 3.98, зліва). У випадку аналізу слини, аналогічний відгук відповідав значенню 50 нА відносно базового сигналу (Рис. 3.98, справа). Для з'ясування, яким саме концентраціям L-лактату відповідають дані величини струму, було проведене калібрування відповідного біоелектрода (Рис. 3.99).

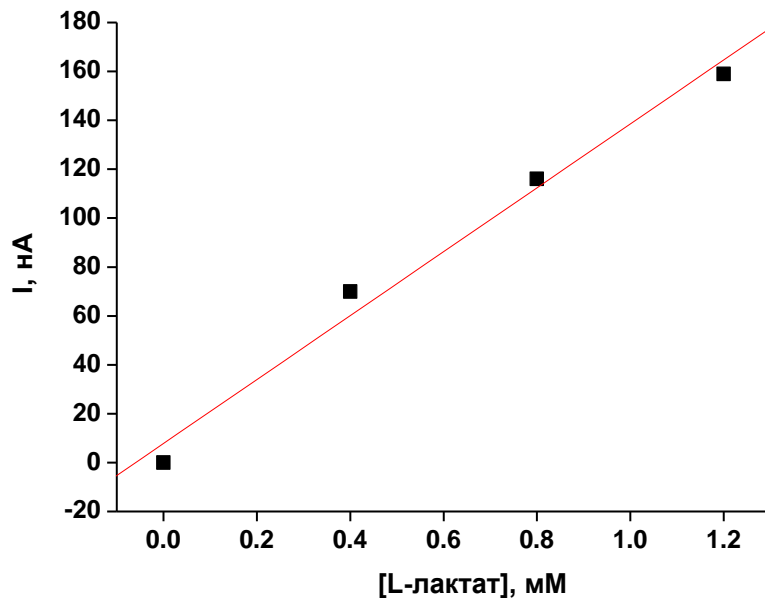


Рис. 3.99. Калібрувальна крива, що відповідає лінійному діапазону концентрацій L-лактату, для прототипу L-лактат-селективного біоелектрода. Наведено дані для типового експерименту.

Калібрування біоелектрода проводили при кімнатній температурі в скляній комірці об'ємом 50 мл, заповненій 25 мл 30 мМ фосфатного буферу, рН 7,8. Біоелектрод поміщали в інтенсивно перемішуваний розчин і, після встановлення базового сигналу при робочому потенціалі 300 мВ, в комірку вносили зростаючі концентрації L-лактату.

Методом інтраполяції величин струму, отриманих при аналізі поту та слини, на калібрувальну криву L-лактат-селективного біоелектрода визначено, що відгук 170 нА відповідає концентрації 1,2 мМ, а 50 нА – 0,32 мМ L-лактату.

Для оцінки точності прямого неінвазивного визначення L-лактату в поті та слині розробленим прототипом L-лактат-селективного біоелектрода на основі ФЦ  $b_2$ , використано метод «множинних внесень стандарту» (Рис. 3.100).

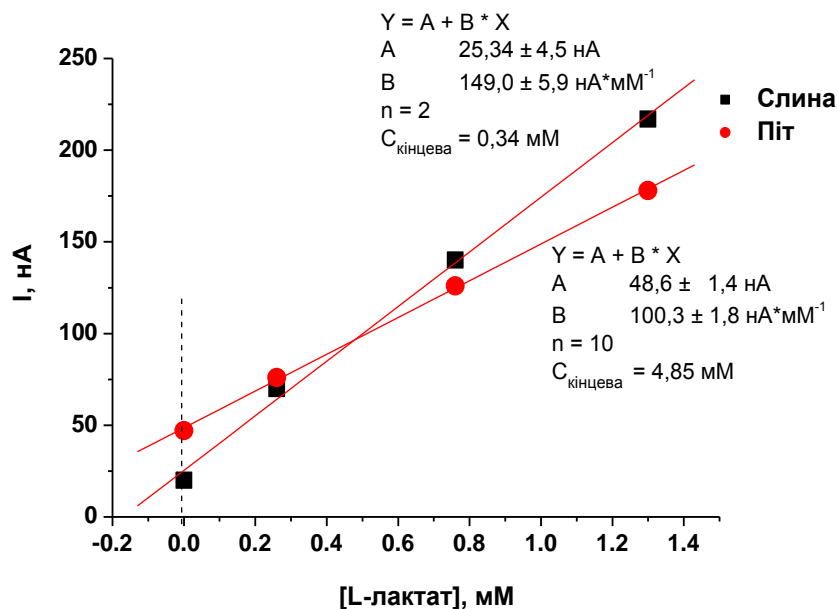


Рис. 3.100. Калібрувальні криві визначення вмісту L-лактату прототипом L-лактат-селективного біоелектроду на основі ФЦ  $b_2$  в зразках слини та поту методом множинних внесень стандарту. Наведено дані для типового експерименту.

Отже, методом множинних внесень стандарту за використання розробленого біоелектроду на основі ФЦ  $b_2$  визначено, що в зразках слини рівень лактату складає 0,34 мМ, а для поту - 4,85 мМ (Рис. 3.100). Таким чином, для зразка слини відповідність результатів прямого визначення та методу множинних внесень стандарту становила 94 % (0,32 проти 0,34 мМ L-лактату). Отримані результати добре корелюють із літературними даними [207]. Водночас, результати аналізу L-лактату у зразках поту за використання методу прямого визначення L-лактату суттєво відрізнялись у порівнянні з методом множинних внесень стандарту (1,2 мМ проти 4,85 мМ L-лактату). Із літературних джерел відомо, що рівень лактату в поті людини в стані спокою знаходиться в межах 4 - 40 мМ [233], що є близьким для результатів, отриманих методом множинних

внесень стандарту для прототипу L-лактат-селективного біоелектроду (4,85 мМ L-лактату).

Для з'ясування причин невідповідності результатів визначення L-лактату у поті двома підходами, проведено пряме визначення L-лактату в зразках біологічних рідин, зокрема поту, сенсорним аналізатором «ФОРМАТЕСТ-2010» в автоматичному режимі представлено на Рис. 3.101.

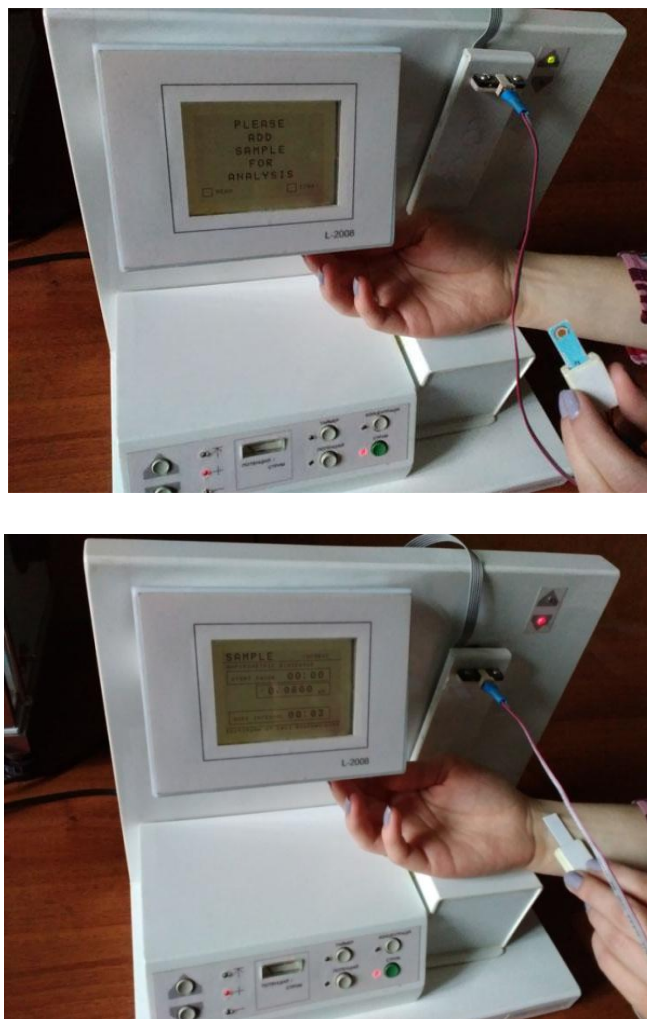


Рис. 3.101. Вимірювання концентрації L-лактату сенсорним аналізатором «ФОРМАТЕСТ-2010» в автоматичному режимі.

У результаті прямого визначення вмісту L-лактату за допомогою амперометричного аналізатора «ФОРМАТЕСТ-2010» в автоматичному режимі

отримано наступні значення:  $5,2 \pm 0,8$  мМ в поті та  $0,36 \pm 0,4$  мМ L-лактату у слині.

Порівняння різних підходів аналізу вмісту L-лактату в слині та поті людини (методом стандартних внесень, прямого (хроноамперометричного) аналізу за допомогою потенціостату та аналізаторної системи «ФОРМАТЕСТ-2010») наведено у таблиці 3.21.

Табл. 3.21.

Порівняння результатів визначення вмісту L-лактату (мМ) в зразках слини та поту людини з використанням різних підходів

Метод Зразок	Прямий (хроноамперометричний) метод	Метод «множинних внесень стандарту»	Сенсорний аналізатор «ФОРМАТЕСТ-2010»
<b>Слина</b>	$0,32 \pm 0,8$	$0,34 \pm 0,3$	$0,36 \pm 0,4$
<b>Піт</b>	$1,2 \pm 1,0$	$4,85 \pm 0,6$	$5,2 \pm 0,8$

Отримані результати визначення L-лактату у слині -  $0,32 - 0,36$  мМ і  $4,85 - 5,2$  мМ L-лактату в поті людини в стані спокою добре узгоджуються з літературними даними [207, 233]. Водночас, результати аналізу L-лактату у зразках поту за використання методу прямого (хроноамперометричного) аналізу суттєво відрізнялись у порівнянні з результатами, отриманими методом «множинних внесень стандарту» та прямим аналізом на приладі «ФОРМАТЕСТ-2010» -  $1,2$  мМ проти  $4,85$  та  $5,2$  мМ L-лактату, відповідно. Із літературних джерел відомо, що рівень лактату в поті людини в стані спокою знаходиться в межах  $4-16$  мМ [233], що є близьким до результатів, отриманих методом множинних внесень стандарту та за допомогою аналізатора «ФОРМАТЕСТ-2010». Причини невідповідності результатів визначення L-лактату у поті хроноамперометричним підходом можна пояснити занадто високою чутливістю біосенсора і, як наслідок, низькою верхньою межею лінійності визначення

L-лактату (до 1,2 мМ). Даний недолік можна усунути модифікувавши операційні параметри біоелектродів, зокрема, знизивши афанність біосенсорної системи до L-лактату (за рахунок зниження афінності фермента до субстрату) [190, 234], розширивши межі лінійного діапазону визначення (за рахунок зниження ефективності перенесення електронів у біоселективній мембрані) [235], або знизивши проникність біоселективної мембрани для субстрату (за рахунок збільшення її товщини чи зменшення її пористості).

### 3.6.5. Підсумки

Розроблено амперометричний мікробний біосенсор на основі клітин штаму-надпродуцента ФЦ  $b_2$  – *O. polymorpha* «tr1» та поєднання електроосаджуваного полімеру і низькомолекулярного медіатора електронного перенесення. Мікробний біосенсор характеризується високою операційною стабільністю та стабільністю при зберіганні у порівнянні з аналогічним ензимним біосенсором на основі очищеного ферменту. Сконструйовано безмедіаторний мікробний біосенсор на основі клітин *O. polymorpha* «tr1». Біосенсор базувався на принципі електрохімічного виявлення L-лактату, в основі якого лежить конкуренція за споживання кисню між робочим електродом і апаратом дихання дріжджових клітин. Синтезовано нонорозмірні носії ферментів на основі золота. Розроблено новий метод формування золотих наночастинок на поверхні робочого планарного електроду *in situ*. За використання скануючої електронної мікроскопії, рентгеноспектрального аналізу, атомно-силової мікроскопії та трансмісійної електронної мікроскопії проведено фізико-хімічну і структурну характеристику отриманих наноматеріалів. 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. На основі пермеабілізованих клітин штаму-надпродуцента ФЦ  $b_2$  *O. polymorpha* «tr1» сконструйовано нові мікробні амперометричні біосенсори з покращеними біоаналітичними характеристиками. Розроблений новий високочутливий ЕС-підхід для SECM-візуалізації локальної окисно-відновної електроактивності ФЦ  $b_2$ . Продемонстровано ефективність використання розробленого методу як для кількісного аналізу L-лактату, так і для характеристики поверхні біоселективного елемента при конструюванні ензимних амперометричних біосенсорів. Розроблено новий ензимний безмедіаторний амперометричний біосенсор «третього покоління» на L-лактат на основі очищеного рекомбінантного ФЦ  $b_2$  та наночастинок золота. Уперше використано препарати ФЦ  $b_2$  для неінвазійного біосенсорного моніторингу вмісту лактату в біологічних рідинах людини (поті, слині) та безпосередньо при контакті біоелектроду зі шкірою. 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 флавоцитхром  $b_2$ , мікробні біосенсори характеризувалися високою селективністю до D-енантіомера лактату. Розроблені біоаналітичні підходи на основі рекомбінантних клітин, клітинних уламків та очищених ферментів використано для аналізу L- та D-лактату в реальних зразках рідин людини, харчових продуктів та фармацевтичних препаратів трансфузійного призначення.

Результати досліджень, описані в розділі 3.6, опубліковано в статтях [173, 181, 183, 190, 220, 221, 226, 230, 234, 236-238, 240-243].



## РОЗДІЛ 4

### УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

У даній дисертаційній роботі реалізовано такі основні завдання:

- конструювання дріжджових штамів – надпродуцентів L- і D-лактат-селективних оксидоредуктаз *Ogataea polymorpha*;
- очистка цільових ферментів та їх характеристика;
- розробка на їх основі, у поєднанні із нанорозмірними матеріалами, нових спектрофотометричних і біосенсорних методів визначення L- та D-лактату;
- описано також створення біореакторів для продукції чистого D-енантіомера із рацемату молочної кислоти та усунення D-лактату в модельних сумішах за використання відповідних L- і D-лактат-селективних оксидоредуктаз.

Для створення продуцентів L- та D-лактат: ферицитохром *c*-оксидоредуктаз сконструйовано рекомбінантні штами метилотрофних дріжджів *O. polymorpha*. Основна ідея досліджень полягала у клонуванні відповідних генів (*CYB2* для L-лактат: ферицитохром *c*-оксидоредуктази, флавоцитохрому *b<sub>2</sub>*, ФЦ *b<sub>2</sub>*) та *DLD1* (для D-лактат: ферицитохром *c*-оксидоредуктази, *DLDH*) під сильний конститутивний промотор *pAOX* у складі вектора мультикопійної інтеграції *pGLG61*. Як реципієнтний, використано мутантний штам *O. polymorpha* C-105 (*gcr1 catX*), який характеризується порушеною глюкозною катаболітною репресією [174, 175], що забезпечує конститутивне функціонування промотора *AOX*, а також пошкоджено ген каталази, що полегшує виділення цільових ферментів без домішок каталази [244]. Таким чином, отримано рекомбінантний штам дріжджів *O. polymorpha* «tr1» (*gcr1 catX CYB2*) - надпродуцент ФЦ *b<sub>2</sub>*, що характеризується восьмикратним підвищенням питомої активності відповідного ферменту, та продуцент *DLDH* - *O. polymorpha* «tr6» (*gcr1 catX cyb2Δ/DLD1*), питома активність *DLDH* якого збільшилась у шість разів, порівняно з вихідними

штамами. Для позбавлення специфічної L-лактат: цитохром *c* оксидоредуктазної активності у продуцента DLDH, проведено делецію гена *CYB2* у батьківському штамі *O. polymorpha* C-105 (*gcr1 catX*), а вже на наступному етапі, гомологічний ген *DLD1* надекспресовано в штамі *sub2Δ* під контролем сильного конститутивного промотора гена *AOX*. Для обох рекомбінантних штамів дріжджів оптимізовано умови синтезу цільових ферментів.

Оскільки описані в літературі методи виділення L- та D-лактат-специфічних оксидоредуктаз із клітин дріжджів є низькоефективні, а на світовому ринку на сьогодні відсутні комерційні препарати обох ферментів, нами проведено дослідження, спрямовані на розробку ефективних схем виділення, очистки і стабілізації цих ферментів із термотолерантних рекомбінантних штамів *O. polymorpha*. Для забезпечення ефективної екстракції ФЦ  $b_2$  із уламків клітин дріжджів *O. polymorpha* «tr1», проведено скринінг іоногенних та нейтральних детергентів та підібрано оптимальне їх поєднання. Для очистки ФЦ  $b_2$  із екстрактів клітин, уперше розроблено новий метод його очищення афінною хроматографією за використання синтезованого нами сорбента амілопропілсилохрому, модифікованого цитохромом *c* в ролі ліганда. Отримано препарати фермента з питомою активністю 10 Од·мг<sup>-1</sup>. Для очищення DLDH із клітин штаму дріжджів *O. polymorpha* «tr6», розроблено схему за використання іонообмінної хроматографії та отримано очищений фермент із питомою активністю 1,1 Од·мг<sup>-1</sup>. Для обох ферментних препаратів проведено фізико-хімічну та ензимологічну характеристику.

Для створення лабораторних прототипів колонкових біореакторів для конверсії рацемату молочної кислоти до оптично чистого D-ізомера та усунення токсичного D-лактату на модельних сумішах молочнокислих продуктів використано препарати очищеного ФЦ  $b_2$  та пермеабілізовані клітини *O. polymorpha* «tr6», іммобілізовані в альгінатному гелі. Показано, що

ефективність усунення D-лактату клітинами значним чином залежить від швидкості потоку через біореактор. Доведено принципова можливість використання продуцентів L- та D-лактат-специфічних оксидоредуктаз для продукції чистого D-енантіомера із рацемату молочної кислоти та усунення D-лактату із модельних сумішей.

Для розробки нового ензиматично-фотометричного методу кількісного аналізу L-лактату використано поєднання ензиматичного окислення L-лактату із хімічною реакцією між фероціанідом  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4+}$ , генерованим внаслідок ензиматичної реакції, та іонами заліза (III). Внаслідок цих реакцій, за присутності щавлевої кислоти у ролі солубілізатора, утворюється інтенсивно забарвлений барвник «Берлінська блакить», придатний для колориметричного аналізу. На основі розробленого підходу створено ензиматичний набір для кількісного визначення L-лактату та одержано Патент на винахід США (No. WO/2009/009656 від 15.01.2009) та Патент на корисну модель України (№ 45283 від 10.11.2009 р.). Параметри опрацьованого ензиматичного набору для кількісного аналізу L-лактату, у порівнянні з найближчими комерційними аналогами, представлено в Табл. 4.1.

Табл. 4.1.

Порівняння переваг (позначено «+») та недоліків (представлено «-») комерційних аналогів та створеного ензиматичного набору для кількісного аналізу L-лактату

Фірма/Продукт	Фермент	Порогова чутливість, мМ	Селективність	Час аналізу, хв	Ціна для 100 аналізів
BioVision / « <i>L-lactate kit</i> » [87]	NAD <sup>+</sup> -лактат-дегідрогеназа + додаткові ферменти (не зазначено)	0,020	+	40	\$ 475,0
Megazyme / « <i>L- and D-lactate kits</i> » [96]	NAD <sup>+</sup> -лактат-дегідрогеназа + глутамат-піруват трансаміназа	0,023	-	15	\$ 335,0
Labtest / « <i>Enzymatic Lactate</i> » [88]	Лактаоксидаза + пероксидаза	0,044	-		\$ 300,0
Дана робота / « <i>Лактатест</i> »	Флавоцитохром $b_2$	0,003	+	30	Значно нижча

Таким чином, створений новий ензиматичний набір для визначення вмісту L-лактату за використання ФЦ  $b_2$  та «Берлінської блакиті» переважає найближчі комерційні аналоги за більшістю параметрів.

Окрім того, для здешевлення набору, нами запропоновано спосіб багатократного використання фермента, іммобілізованого на феромагнітних

мікрочастинках. Показано, що ензимні мікрочастинки можна усувати з реакційної суміші у магнітному полі та повторно використовувати не менше шести разів без втрати якості аналізу L-лактату.

За основу методу фотометричного кількісного аналізу D-лактату на основі пермеабілізованих клітин *O. polymorpha* «tr6» чи субклітинних фракцій, збагачених мітохондріями, використано принцип ферментативного відновлення нітротетразолієвого синього до кольорового продукту – формазану (у присутності феназинметасульфату як медіатора), з наступною детекцією оптичної густини реакційної суміші.

При конструюванні високостабільного амперометричного мікробного біосенсора на основі пермеабілізованих клітин штаму-надпродуцента ФЦ  $b_2$  – *O. polymorpha* «tr1» нами використано поєднання електроосаджуваного полімеру для іммобілізації клітин і низькомолекулярного медіатора для ефективного електронного перенесення. Мікробний біосенсор характеризується високою операційною стабільністю (понад 360 незалежних вимірювань) і стабільністю при зберіганні (більше 2 місяців при 4 °C) у порівнянні з аналогічним ензимним біосенсором на основі очищеного ферменту (стабільність при зберіганні становила 7 днів при 4 °C) [217], що можна пояснити збереженням нативної структури ФЦ  $b_2$  у природному оточенні – мембранах дріжджових мітохондрій.

При конструюванні безмедіаторного мікробного біосенсора на основі клітин штаму-надпродуцента ФЦ  $b_2$  – *O. polymorpha* «tr1», нами використано принцип електрохімічного виявлення L-лактату, в основі якого лежить конкуренція за споживання кисню між робочим електродом і мітохондріальним апаратом дихання дріжджових клітин. Розроблений безмедіаторний мікробний біосенсор може бути використано не лише для кількісного аналізу L-лактату, а й при дослідженні впливу надекспресії ключових компонентів дихального ланцюга на метаболізм субстратів дихання у рекомбінантних дріжджових клітинах.

Для біосенсорного використання синтезовано нонорозмірні носії ферментів на основі золота, використовуючи принцип відновлення  $\text{H}[\text{AuCl}_4]$  боргідритом натрію  $\text{NaBH}_4$ . Опрацьовано новий метод формування золотих наночастинок/нонокластерів на поверхні робочого планарного електроду відновлення  $\text{Au}^{3+}$  пероксидом водню *in situ*. За використання сканувальної електронної мікроскопії, рентгеноспектрального аналізу, атомно-силової мікроскопії та трансмісійної електронної мікроскопії проведено фізико-хімічну і структурну характеристику отриманих біонаноматеріалів.

При конструюванні нових мікробних амперометричних біосенсорів з покращеними біоаналітичними характеристиками використано пермеабілізовані клітини штаму-надпродуцента ФЦ  $b_2$  – *O. polymorpha* «tr1» та рекомбінантні клітини, додатково збагачені ферментом, зв'язаним із золотими наночастинками. Вперше показано, що збагачення клітин дріжджів ФЦ  $b_2$ , за рахунок надекспресії відповідного гена та додаткового введення в клітини золотих наночастинок з іммобілізованим ферментом, суттєво покращує основні операційні характеристики біосенсора (чутливість, порогову межу визначення, стабільність при зберіганні).

Нами запропоновано принципово новий високочутливий амперометричний метод візуалізації локальної ензиматичної активності для SECM-аналізу, що базується на субстрат-залежній конкуренції між ферментом, іммобілізованим у сканувальному зразку, і ферментом, наявним на робочій поверхні мікроелектроду. На відміну від описаних SECM-методів, запропонований підхід ферментативної конкуренції демонструє високу чутливість і хорошу якість візуалізації каталітичної активності сканованого зразка та може використовуватись як для кількісної оцінки вмісту L-лактату, так і для характеристики поверхні біоселективного елемента при конструюванні ензимних амперометричних біосенсорів.

Для створення безмедіаторного ензимного біосенсора «третього покоління» на L-лактат нами використано здатність відновленого ФЦ  $b_2$  до прямого перенесення електронів на поверхню робочого електроду. Цей процес можливий лише з молекул моношару ферменту, що безпосередньо контактують із поверхнею електроду, за умови водночас правильної орієнтації групи гему в достатній віддалі до електроду. Оскільки ФЦ  $b_2$  – достатньо складна тетрамерна молекула, що містить сумарно 8 доменів, ефективність прямого перенесення електронів є досить низькою для біоелектродів, сформованих за допомогою традиційних методів [217]. Нами висунуто припущення, що крім покращення електропровідності робочих електродів за рахунок збільшення електроактивної поверхні, наночастинки золота можуть суттєво підвищити ефективність прямого перенесення електронів, виступаючи в ролі наномедіатора. На основі очищеного рекомбінантного ФЦ  $b_2$  та наночастинок золота розроблено та охарактеризовано новий ензимний безмедіаторний амперометричний біосенсор «третього покоління» на L-лактат. Основні параметри цього L-лактат-селективного біосенсора, порівняно із найближчими комерційними аналогами відображено в Табл. 4.2.

Порівняння основних параметрів комерційних аналогів та амперометричного біосенсора «третього покоління» для кількісного аналізу L-лактату

Продукт	Порогова чутливість, мМ	Об'єм зразку, мкл	Час аналізу, с	Стабільність при зберіганні, місяці
Lactate Pro 2 [89]	-	0,3	15	18
Biosen [245]	0,5	20	20-45	2
LactateScout+ [90]	0,5	0,2	10	-
StatStrip® Lactate [246]	0,3	0,6	13	24
THE EDGE [247]	0,7	3,0	45	-
Амперометричний біосенсор на основі флавоцитохрому $b_2$ (Дана робота)	0,1	0,5	10	3-4

Розроблений L-лактат-селективний біосенсор «третього покоління» переважає комерційні аналоги, перш за все, за чутливістю та коротшою тривалістю аналізу.

Для створення мікробних біосенсорів на D-лактат використано клітинні уламки, субклітинні фракції, збагачені мітохондріями, та клітини 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. У порівнянні із єдиним описаним аналогом - біосенсором на основі DLDH із пекарських дріжджів, розроблений мікробний біосенсор на основі *O. polymorpha* «tr6» характеризувався суттєво нижчою межею виявлення D-лактату (близько 3 мкМ проти 56 мкМ для аналога) та 53-кратним підвищенням чутливості [134].

Опрацьовані біоаналітичні підходи на основі рекомбінантних клітин, клітинних уламків та очищених ферментів використано для аналізу вмісту L- та D-лактату в реальних зразках рідин людини, харчових продуктів та фармацевтичних препаратів трансфузійного призначення. Слід зазначити, що приготування реальних зразків для запропонованих методів аналізу включала лишень їх розведення і не потребувала додаткової попередньої обробки (депротеїнізації і т.п.). Отримані результати визначення вмісту L-лактату в тестованих зразках добре корелюють із результатами референтних методів та узгоджуються з літературними даними.

Отже, під час виконання дисертаційної роботи, розроблено та застосовано широкий арсенал сучасних генно-інженерних, мікробіологічних, біохімічних, фізико-хімічних, електрохімічних та аналітичних методів дослідження. За допомогою поєднання різних підходів продемонстровано позитивний потенціал поєднання генетичної інженерії дріжджів та нанотехнологій для створення нових селективних біоаналітичних методів і продуктів для кількісного аналізу L- та D-молочної кислоти, придатних для практичного використання у клінічній діагностиці, фармацевтиці, спортивній медицині та харчових технологіях.

## 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 *Ogataea 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 нонорозмірні 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.

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.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Yang, L.; Overdorf, G.; Kissinger, P. Determination of Lactate with Liquid Chromatography/Electrochemistry Coupled with Lactate Oxidase IMER. *Bioanalyt. Systems* **1997**, *16* (1), pp 15-18.
2. Bleiberg, B.; Steinberg, J.J.; Katz, S.D.; Wexler, J.; LeJemtel, T. Determination of plasma lactic acid concentration and specific activity using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* **1991**, *568* (2), pp 301-308.
3. Ling, B.; Peng, F.; Alcorn, J.; Lohmann, K.; Bandy, B.; Zello, G.A. D-Lactate altered mitochondrial energy production in rat brain and heart but not liver. *Nutr. Metab. (Lond)*. **2012**, *9* (1), pp 1-6.
4. Hove, H.; Mortensen, P.B. Colonic lactate metabolism and D-lactic acidosis. *Dig. Dis. Sci.* **1995**, *40*, pp 320-330.
5. Bianchetti, D.; Amelio, G.S.; Lava, S.; Bianchetti, M.G.; Simonetti, G.D.; Agostoni, C.; Fossali, E.F.; Milani, G.P. D-lactic acidosis in humans: systematic literature review. *Pediatr. Nephrol.* **2018**, *33* (4), pp 673-681.
6. Uribarri, J.; Oh, M.; Carroll, H. D-Lactic acidosis. *Medicine* **1998**, *77*, pp 73-82.
7. Christopher, M.M.; Broussard, J.D.; Fallin, C.W.; Drost, N.J.; Peterson M.E. Increased serum D-lactate associated with diabetic ketoacidosis. *Metabolism.* **1995**, *44* (3), pp 287-290.
8. Hasegawa, H.; Fukushima, T.; Lee, J.A.; Tsukamoto, K.; Moriya, K.; Ono, Y.; Imai, K. Determination of serum D-lactic and L-lactic acids in normal subjects and diabetic patients by column-switching HPLC with pre-column fluorescence derivatization. *Anal Bioanal Chem.* **2003**, *377* (5), pp 886-891.

9. Ratliff, D.M.; Vander Jagt, D.J.; Eaton, R.P.; Vander Jagt, D.L. Increased levels of methylglyoxal-metabolizing enzymes in mononuclear and polymorphonuclear cells from insulin-dependent diabetic patients with diabetic complications: aldose reductase, glyoxalase I. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1996**, *81* (2), pp 488-492.
10. Thornalley, P.J.; Hooper, N.I.; Jennings, P.E.; Florkowski, C.M.; Jones, A.F.; Lunec, J.; Barnett, A.H. The human red blood cell glyoxalase system in diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **1989**, *7* (2), pp 115-120.
11. Gross, J.L.; de Azevedo, M.J.; Silveiro, S.P.; Canani, L.H.; Caramori, M.L.; Zelmanovitz, T. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. *Diabetes Care.* **2005**, *28* (1), pp 164-176.
12. Thornalley, P.J. Glycation in diabetic neuropathy: characteristics, consequences, causes, and therapeutic options. *Int. Rev. Neurobiol.* **2002**, *50*, pp 37-57.
13. Phillips, S.A.; Mirrlees, D.; Thornalley, P.J. Modification of the glyoxalase system in streptozotocin-induced diabetic rats. Effect of the aldose reductase inhibitor Statil. *Biochem Pharmacol.* **1993**, *46* (5), pp 805-811.
14. Ackland, M.R.; Reeder, J.E. A rapid chemical spot test for the detection of lactic acid as an indicator of microbial spoilage in preserved foods. *Appl. Bacteriol.* **1984**, *56* (3), pp 415-419.
15. Holzinger, M.; Le Goff, A.; Cosnier, S. Nanomaterials for biosensing applications: a review. *Front Chem.* **2014**, *2*, pp 1-10.
16. Черноусова С.; Еплє. М. Наночастинки в медицині. *Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології* **2012**, *10*, (3), с 667-685.
17. Vegeera, A.V.; Zimon, A.D. Synthesis and physicochemical properties of silver nanoparticles stabilized by acid gelatin. *Russian Journal of Appl. Chemistry.* **2006**, *79* (9), pp 1403-1406.

18. Brooks, G.A. Lactate shuttles in Nature. *Biochem. Soc. Transactions*. **2002**, *30* (2), pp 258-264.
19. Branduardi, P.; Sauer, M.; Gioia, L.; Zampella, G.; Valli, M.; Mattanovich, D.; Porro, D. Lactate production yield from engineered yeasts is dependent from the host background, the lactate dehydrogenase source and the lactate export. *Microb. Cell Factories*. **2006**, *5* (4), pp 1-12.
20. Casal, M.; Paiva, S.; Andrade, R.P.; Gancedo, C.; Leao, C. The lactat-proton symport of *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by JEN1. *J. of Bacteriology*. **1999**, *181* (8), pp 2620-2623.
21. Bojunga, N.; Entian, K.D. Cat8p, the activator of gluconeogenic genes in *Saccharomyces cerevisiae*, regulates carbon source-dependent expression of NADP-dependent cytosolic isocitrate dehydrogenase (Idp2p) and lactate permease (Jen1p). *Mol.Gen.Genet*. **1999**, *262* (4-5), pp 869-875.
22. Andrade, R.P.; Casal, M. Expression of the lactate permease gene *JEN1* from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Fungal Genet. Biol.* **2001**, *32* (2), pp 105-111.
23. Paiva, S.; Kruckeberg, A.L.; Casal, M. Utilization of green fluorescent protein as a marker for studying the expression and turnover of the monocarboxylate permease Jen1p of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*. **2002**, *363* (1), pp 737-744.
24. Makuc, J.; Cappellaro, C.; Boles, E. Co-expression of a mammalian accessory trafficking protein enables functional expression of the rat MCT1 monocarboxylate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **2004**, *4* (8), pp 795-801.
25. Soares-Silva, I.; Schuller, D.; Andrade, R.P.; Baltazar, F.; Cassio, F.; Casal, M. Functional expression of the lactate permease Jen1p of *Saccharomyces cerevisiae* in *Pichia pastoris*. *Biochem. J*. **2003**, *376* (3), pp 781-787.



26. Lodi, T.; Fontanesi, F.; Guiard, B. Co-ordinate regulation of lactate metabolism genes in yeast: the role of the lactate permease gene *JEN1*. *Mol. Genet. Genomics*. **2002**, *266* (5), pp 838-847.
27. Alberti, A.; Goffrini, P.; Ferrero, I.; Lodi, T. Cloning and characterization of the lactate-specific inducible gene *KlCYB2*, encoding the cytochrome b(2) of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*. **2000**, *16* (7), pp 657-665.
28. Эйхгорн Г. М., Ред. *Неорганическая биохимия*; Мир: Москва **1978**, 2.
29. Ghirir, R.; Becam, A.; Lederer, F. Primary structure of flavocytochrome b2 from Baker's yeast. Purification by reverse-phase high-pressure liquid chromatography and sequencing of fragment a cyanogen-bromide peptides. *Eur. J. Biochem*. **1984**, *139*, pp 59-65.
30. Haumont, P.Y.; Thomas, M.A.; Labeyrie, F.; Lederer, F. Amino-acid sequence of the cytochrome-b5-like heme-binding domain from *Hansenula anomala* flavocytochrome b2. *Eur. J. Biochem*. **1987**, *169* (3), pp 539-546.
31. Silvestrini, M.C.; Teogoni, M.; Celerier, J. Expression in *Escherichia coli* of the flavin and the haem domains of *Hansenula anomala* flavocytochrome b2 (flavodehydrogenase and b2 core) and characterization of the recombinant proteins. *Biochem J*. **1993**, *295* (2), pp 501-508.
32. Berardi, E. Genetics and molecular biology of methylotrophic yeasts. *Yeasts in Natural and Artificial Habitats*; Spencer, J.F.T.; Spencer, D.M. Eds.; Springer-Verlag: Berlin, **1997**, pp 264-294.
33. Viola, A.M.; Lodi, T.; Ferrero, I. A *Klaac* null mutant of *Kluyveromyces lactis* is complemented by a single copy of the *Saccharomyces cerevisiae* *AAC1* gene. *Curr. Genet*. **1999**, *36* (1-2), pp 29-36.

34. Appleby, C.; Morton, R. Lactic dehydrogenase and Cytochrome b<sub>2</sub> of Bakers' yeast. *Biochem. J.* **1959**, *73*, pp 539-550.
35. Armstrong, J.; Coates, J.; Morton, R. Physicochemical studies on cytochrome b<sub>2</sub>. Sedimentation, diffusion and electrophoresis of the crystalline deoxyribonucleoprotein. *Biochem. J.* **1963**, *86*, pp 136-142.
36. Urban, P.; Lederer, F. Inactivation of flavocytochrome b<sub>2</sub> with fluoropyruvate. Reaction at the active-site histidine. *Eur. J Biochem.* **1988**, *173* (1), pp 155-162.
37. Mulet, C.; Lederer, F. Bromopyruvate as an affinity label for baker's yeast flavocytochrome b<sub>2</sub>. Kinetic study of the inactivation reaction. *Eur. J Biochem.* **1977**, *73* (2), pp 443-447.
38. Nygaard, A. Lactate Dehydrogenases of Yeast. *The Enzymes* **1963**, *7* (2), pp 557.
39. Jacq, C.; Lederer, F. Cytochrome b<sub>2</sub> from Bakers' Yeast (L-lactate Dehydrogenase). A Double-Headed Enzyme. *Eur. J. Biochem.* **1974**, *41*, pp 311.
40. Jacq, C.; Lederer, F. Molecular Weight and Quaternary Structure of Yeast L-Lactate Dehydrogenase (Cytochrome b<sub>2</sub>). I. Minimum Molecular Weight from Amino Acid Analysis. *Eur. J. Biochem.* **1970**, *12*, pp 154-162.
41. Jacq, C.; Lederer, F. Two Molecular Species of Cytochrome B<sub>2</sub> from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **1972**, *25*, pp 41.
42. Lederer, F. On the first steps of lactate oxidation by Bakers' yeast L-(+)-lactate dehydrogenase (cytochrome b<sub>2</sub>). *Eur. J. Biochem.* **1974**, *46*, pp 393-399.
43. Celerier, J.; Risler, Y.; Schwencke, J. Isolation of the flavodehydrogenase domain of *Hansenula anomala* flavocytochrome b<sub>2</sub> after mild proteolysis by an *H. anomala* proteinase. *Eur. J. Biochem.* **1989**, *182* (1), pp 67-75.

44. White, P.; Manson, F.D.; Brunt, C.E. The importance of the interdomain hinge in intramolecular electron transfer in flavocytochrome b<sub>2</sub>. *Biochem J.* **1993**, *291* (1), pp 89-94.
45. Xia, Z.; Shamala, N.; Bethge, P.; Lim, L.; Bellamy, H.; Xuong, N.; Lederer, F.; Mathews, F.S. Three-dimensional structure of flavocytochrome b<sub>2</sub> from baker's yeast at 3.0-Å resolution. *Biochemistry* **1987**, *84*, pp 2629-2633.
46. Albani, J. Fluorescence studies on the interaction between two cytochromes extracted from the yeast, *Hansenula anomala*. *Arch. Biochem. Biophys.* **1985**, *243* (1), pp 292-297.
47. Capeillere-Blandin, C. Flavocytochrome b<sub>2</sub>-cytochrome c interactions: the electron transfer reaction revisited. *Biochimie* **1995**, *77* (7-8), pp 516-530.
48. Thomas, M.A.; Delsuc, M.A.; Beloeil, J.C. <sup>1</sup>H-NMR investigation of yeast cytochrome c. Interaction with the corresponding specific reductase (L-lactate cytochrome). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, *45* (3) pp 1098-1004.
49. Sharp, R.; Chapman, S.; Reid, G. Deletion in the Interdomain Hinge Region of Flavocytochrome b<sub>2</sub>: Effect on Intraprotein Electron Transfer. *Biochemistry.* **1996**, *35*, pp 891-899.
50. Tegoni, M.; Janot, J.M.; Labeyrie, F. Inhibition of L-lactate: cytochrome-c reductase (flavocytochrome b<sub>2</sub>) by product binding to the semiquinone transient. Loss of reactivity to wards monoelectronic acceptors. *Eur. Biochem. J.* **1990**, *190*, pp 329-342.
51. Rouviere, N.; Mayer, A.; Tegoni, M.; Capeillere-Blandin, C.; Lederer, F. Molecular interpretation of inhibition by excess substrate in flavocytochrome b<sub>2</sub>: a study with wild-type and Y143F mutant enzymes. *Biochemistry.* **1997**, *34*, pp 7126-7135.

52. Gregolin, C.; Singer, T.P. The lactic dehydrogenase of yeast. III. D(2)lactic cytochrome *c* reductase, a zinc flavoprotein from aerobic yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* **1963**, *67*, pp 201-218.
53. Dym, O.; Pratt, E.A.; Ho, C.; Eisenberg, D. The crystal structure of D-lactate dehydrogenase, a peripheral membrane respiratory enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97* (17), pp 9413-9418.
54. Lodi, T.; O'Connor, D.; Goffrini, P., Ferrero, I. Carbon catabolite repression in *Kluyveromyces lactis*: isolation and characterization of the KIDLD gene encoding the mitochondrial enzyme D-lactate ferricytochrome *c* oxidoreductase. *Mol. Gen. Genet.* **1994**, *244*, pp 622-629.
55. Lodi, T.; Ferrero, I. Isolation of the DLD gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding the mitochondrial enzyme D-lactate ferricytochrome *c* oxidoreductase. *Mol. Gen. Genet.* **1993**, *238*, pp 315-324.
56. Sun, Z.Y.; Dowd, S.R.; Felix, C.; Hyde, J.S.; Ho, C. Stopped-flow kinetic and biophysical studies of membrane-associated D-lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta.* **1995**, *1252* (2), pp 269-77.
57. Nygaard, A.P. Induction of D(2)- and L(1)-lactic cytochrome reductase in yeast. *J. Biol. Chem.* **1961**, *236*, pp 1585-1588.
58. Cremona, T.; Singer, T.P. The Lactic Dehydrogenases of Yeast. *J. of Biol. Chem.* **1964**, *239* (5), pp 1466-1473.
59. Agnar, P.N. Induction of D(-)- and L(+)-Lactic cytochrome *c* reductase in yeast. *J. of Biol. Chem.* **1961**, *236*, pp 1585-1588.
60. Ramil, E.; Agrimonti, C.; Shechter, E.; Gervais, M.; Guiard, B. Regulation of the *CYB2* gene expression: transcription co-ordination by the Hap1p, Hap2/3/4/5p and Agr1p transcription factors. *Mol. Microbiol.* **2000**, *37* (5), pp 1116-1132.

61. Zitomer, R.S.; Lowry, C.V. Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **1992**, *56*, pp 1-11.
62. Lodi, T.; Alberti, A.; Guiard, B.; Ferrero, I. Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* DLD1 gene encoding the mitochondrial protein D-lactate ferricytochrome c oxidoreductase by HAP1 and HAP2/3/4/5. *Mol. Gen. Genet.* **1999**, *262*, pp 623-632.
63. Goffrini, P.; Ficarelli, A.; Donnini, C.; Lodi, T.; Puglisi, P.P.; Ferrero, I. *FOG1* and *FOG2* genes, required for the transcriptional activation of glucose-repressible genes of *Kluyveromyces lactis*, are homologous to *GAL83* and *SNF1* of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **1996**, *29*, pp 316-326.
64. Lodi, T.; Goffrini, P.; Bolondi, I.; Ferrero, I. Transcriptional regulation of the *KIDL* gene, encoding the mitochondrial enzyme D-lactate ferricytochrome c oxidoreductase in *Kluyveromyces lactis*: effect of *Klhap2* and *fog* mutations. *Curr. Genet.* **1998**, *34*, pp 12-20.
65. Bianchi, M.M.; Brambilla, L.; Protani, F.; Liu, C.L.; Lievens, J.; Porro, D. Efficient homolactic fermentation by *Kluyveromyces lactis* strains defective in pyruvate utilization and transformed with the heterologous LDH gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67* (12), pp 5621-5625.
66. Daff, S.; Manson, F.D.; Reid, G.A.; Chapman, S. Strategic manipulation of the substrate specificity of *Saccharomyces cerevisiae* flavocytochrome b<sub>2</sub>. *Biochem. J.* **1994**, *301*, pp 829-870.
67. Aharaz, A.; Pottegård, A.; Henriksen, D.P.; Hallas, J.; Beck-Nielsen, H.; Lassen, A.T. Risk of lactic acidosis in type 2 diabetes patients using metformin: A case control study. *PLoS One.* **2018**, *13* (5), pp 1-13.

68. Jain, M.; Nagar, P.; Sharma, A.; Bath, R.; Aggarwal, S.; Kumari, S.; Mustafiz, A. GLYI and D-LDH play key role in methylglyoxal detoxification and abiotic stress tolerance. *Scientific Reports*. **2018**, 8 (1), pp P. 1-9.
69. Frommer, J.P. Lactic acidosis. *Med. Clin. North. Am.* **1983**, 67 (4), pp 815-829.
70. Artiss, J.D.; Karcher, R.E.; Cavanagh, K.T.; Collins, S.L.; Peterson, V.J.; Varma, S.; Zak, B. A liquid-stable reagent for lactic acid levels. Application to the Hitachi 911 and Beckman CX7. *Am. J. Clin. Pathol.* **2000**, 114 (1), pp 139-143.
71. Kost, G.J.; Nguyen, T.H.; Tang, Z. Whole-blood glucose and lactate. Trilayer biosensors, drug interference, metabolism, and practice guidelines. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2000**, 124 (8), pp 1128-1134.
72. Jones, A.M.; Carter, H. The effect of endurance training on parameters of aerobic fitness. *Sports. Med.* **2000**, 29 (6), pp 373-386.
73. Герасимов, І.Г.; Плаксіна О.М. Неферментативне визначення лактату та пірувату в одній пробі крові. *Лабораторна діагностика*. **2000**, 2, сс 46-47.
74. Araujo, A.N.; Lima, J.C.; Saraiva, M.; Lucia, F.S.; Zagatto, E.A. A new approach to dialysis in sequential injection systems: spectrophotometric determination of L(+)-lactate in wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. **1997**, 48 (4), pp 428-432.
75. Павлішко, Г.М.; Майдан, М.М.; Гончар, М.В.; Сибірний, А.А. Новий оксидазний метод визначення лактату. *Укр. біохім. журн.* **2002**, 74 (2), сс 134-139.
76. Mi-Young, H.; Je-Young, C.; Hyun, Y.; Hak-Sung, K. Development of a screen-printed amperometric biosensor for the determination of L-lactate dehydrogenase level. *Biosens. Bioelectron.* **2002**, 17 (1-2), pp 13-18.

77. Rahman, M.M.; Shiddiky, M.J.; Rahman, M.A.; Shim, Y.B. A lactate biosensor based on lactate dehydrogenase/nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized form) immobilized on a conducting polymer/multiwall carbon nanotube composite film. *Anal Biochem.* **2009**, *384* (1), pp 159-65.
78. Piano, M.; Serban, S.; Pittson, R.; Drago, G.A.; Hart, J.P. Amperometric lactate biosensor for flow injection analysis based on a screen-printed carbon electrode containing Meldola's Blue-Reinecke salt, coated with lactate dehydrogenase and NAD<sup>+</sup>. *Talanta.* **2010**, *82* (1), pp 34-37.
79. Keisuke, H.; Hitoshi, Y.; Kazuhiko, K.; Masaki, O. Novel electron transfer mediators, indoaniline derivatives for amperometric lactate sensor. *Sens. Actuators B Chem.* **2002**, *86* (1), pp 88-93.
80. Dagar, K.; Pundir, C.S. An improved amperometric L-lactate biosensor based on covalent immobilization of microbial lactate oxidase onto carboxylated multiwalled carbon nanotubes/copper nanoparticles/polyaniline modified pencil graphite electrode. *Enzyme Microb. Technol.* **2017**, *96*, pp 177-186.
81. Cunha-Silva, H.; Arcos-Martinez, M.J. Dual range lactate oxidase-based screen printed amperometric biosensor for analysis of lactate in diversified samples. *Talanta.* **2018**, *188*, pp 779-787.
82. Herrero, A.M.; Requena, T.; Reviejo, A.J.; Pingarron, J.M. Determination of l-lactic acid in yoghurt by a bienzyme amperometric graphite-Teflon composite biosensor. *European Food Research and Technol.* **2004**, *219* (5) pp 557-560.
83. Pérez, S.; Fàbregas, E. Amperometric bienzymatic biosensor for L-lactate analysis in wine and beer samples. *Analyst.* **2012**, *137* (16), pp 3854-61.
84. Giménez-Gómez, P.; Gutiérrez-Capitán, M.; Capdevila, F.; Puig-Pujol, A.; Fernández-Sánchez, C.; Jiménez-Jorquera, C. Monitoring of malolactic

fermentation in wine using an electrochemical bienzymatic biosensor for L-lactate with long term stability. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *905*, pp 126-133.

85. Lima, J.; Lopes, T.; Rangel, A. Enzymic determination of L(+) lactic and L(-) malic acids in wines by flow-injection spectrophotometry. *Anal. Chim. Acta* **1998**, *366* (1-3), pp 187-191.
86. Bozimowski, D.; Artiss, J.D.; Zak, B. Sensitive determination of cerebrospinal fluid pyruvate, lactate and glucose concentrations. *Clin. Chim. Acta* **1985**, *153*, pp 63-69.
87. BioVision incorporated. <http://www.biovision.com/lactate-colorimetric-assay-kit-ii.html>
88. Labtest. <https://labtest.com.br/en/reagents/enzymatic-lactate>
89. Lactate Pro. <http://www.lactatepro.com.au/lactatepro/PRODUCT.html>
90. EKF diagnostics. <https://www.ekfdiagnostics.com/lactate-scout.html>
91. Maughan, R.J. A simple, rapid method for the determination of glucose, lactate, pyruvate, alanine, 3-hydroxybutyrate and acetoacetate on a single 20- $\mu$ l blood sample. *Clin. Chim. Acta* **1982**, *122*, pp 231-240.
92. Cuthbert, C.; Alberti, K.G. Combined enzymatic assays for 3-hydroxybutyrate and lactate: end-point and kinetic methods. *Clin. Chim. Acta* **1978**, *90* (2), pp 179-186.
93. Sundaram, P.V.; Hinsch, W. Single- and coupled-enzyme nylon tube reactors for routine determination of pyruvate and lactate in serum. *Clin. Chem.* **1979**, *25* (2), pp 285-288.
94. Noll, F. Methode zur quantitativen Bestimmung von L(+)-Lactate mittels Lactat-Dehydrogenase und Glutamat-Pyruvat-Transaminase. *Biochem. Z.* **1966**, *346*, pp 41-49.



95. Talasniemi, J.P.; Pennanen, S.; Savolainen, H.; Niskanen, L.; Liesivuori, J. Analytical investigation: assay of D-lactate in diabetic plasma and urine. *Clin Biochem.* **2008**, *41* (13), pp 1099-103.
96. Megazyme. <https://secure.megazyme.com/DL-Lactic-Acid-Assay-Kit>
97. MacQueen, J.; Plaut, D. Colorimetric microdetermination of plasma lactate. *Am. J. Med. Technol.* **1979**, *45* (1), pp 34-37.
98. Kikuchi, H.; Sato, T. Colorimetric microdetermination of l-lactate in deproteinized blood. *Tohoku J. Exp. Med.* **1994**, *173* (4), pp 391-397.
99. Buttery, J.E.; Pannall, P.R. Colorimetric measurement of D(-)lactate in plasma. *Clin Biochem.* **1987**, *20* (4), pp 237-239.
100. Shapiro, F.; Silanikove, N. Rapid and accurate determination of d- and l-lactate, lactose and galactose by enzymatic reactions coupled to formation of a fluorochromophore: Applications in food quality control. *Food Chem.* **2010**, *119* (2), pp 829-833.
101. Lin, C.Y.; Chen, S.H.; Kou, G.H.; Kuo, C.M. An enzymatic microassay for lactate concentration in blood and hemolymph. *Acta Zoologica Taiwanica* **1999**, *10* (2), pp 91-101.
102. Durliat, H.; Comtat, M.; Baudras, A. Spectrophotometric and electrochemical determinations of L(+)-lactate in blood by use of lactate dehydrogenase from yeast. *Clin. Chem.* **1976**, *22* (11), pp 1802-1805.
103. Smutok, O.; Karkovska, M.; Smutok, H.; Gonchar, M. Flavocytochrome *b*<sub>2</sub>-Based Enzymatic Method of L-Lactate Assay in Food Products. *The Scientific World Journal* [Online] **2013**, 2013, Article ID 461284, 6 pp. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/461284> (accessed Aug 28, 2013).

104. McLellan, A.C.; Phillips, S.A.; Thornalley, P.J. Fluorimetric assay of D-lactate. *Anal. Biochem.* **1992**, *206* (1), pp 12-16.
105. Karyakin, A.A. Prussian blue and its analogues: electrochemistry and analytical applications. *Electroanalysis* **2001**, *13* (10), pp 813-819.
106. Pereira, A.; Aguiar, M.; Kisner, A.; Macedo, D.; Kubota, L. Amperometric biosensor for lactate based on lactate dehydrogenase and Meldola Blue coimmobilized on multi-wall carbon-nanotube. *Sens. Actuators B* **2007**, *124* (1), pp 269-276.
107. Zhang, F.; Wan, Q.; Li, C.; Wang, X.; Zhu, Z.; Xian, Y.; Jin, L.; Yamamoto, K. Simultaneous monitoring of glucose, lactate, L-glutamate and hypoxanthine levels in rat striatum by a flow injection enzyme electrode array system with in vivo microdialysis sampling. *J. Electroanal. Chem.* **2005**, *575*, pp 1-7.
108. Radoi, A.; Moscone, D.; Palleschi, G. Sensing the lactic acid in probiotic yogurts using an l-lactate biosensor coupled with a microdialysis fiber inserted in a flow analysis system. *Anal. Lett.* **2010**, *43* (7-8), pp 1301-1309.
109. Lobo-Castanon, M.J.; Miranda-Ordieres, A.J.; Tunon-Blanco, P. A bienzyme-poly-(o-phenylenediamine)-modified carbon paste electrode for the amperometric detection of L-lactate. *Anal. Chim. Acta* **1997**, *346* (2), pp 165-174.
110. Hong, M.Y.; Chang, J.Y.; Yoon, H.C.; Kim H.S. Development of a screen-printed amperometric biosensor for the determination of L-lactate dehydrogenase level. *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17* (1-2), pp 13-18.
111. Rosati, G.; Gherardi, G.; Grigoletto, D.; Marcolin, G.; Cancellara, P.; Mammucari, C.; Scaramuzza, M.; De Toni, A.; Reggiani, C.; Rizzuto, R.; Paccagnella, A. Lactate Dehydrogenase and Glutamate Pyruvate Transaminase biosensing strategies for lactate detection on screen-printed sensors. Catalysis efficiency and

- interference analysis in complex matrices: from cell cultures to sport medicine. *Sensing and Bio-Sensing Research* **2018**, *21*, pp 54-64.
112. Miertus, S.; Katrlík, J.; Pizzariello, A.; Stred'ansky, M.; Svitel, J.; Svorc, J. Amperometric biosensors based on solid binding matrices applied in food quality monitoring. *Biosens. Bioelectron.* **1998**, *13* (7-8), pp 911-923.
113. Tap, H.; Gros, P.; Gué, A.M. Amperometric silicon-based biosensor for D-lactate. *Sensors Actuator B* **2002**, *458*, pp 203-213.
114. Parra, A.; Casero, E.; Vázquez, L.; Pariente, F.; Lorenzo, E. Design and characterization of a lactate biosensor based on immobilized lactate oxidase onto gold surfaces. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *555* (2), pp 308-315.
115. Lowinsohn, D.; Bertotti, M. A Biosensor based on Immobilization of Lactate Oxidase in a PB-CTAB Film for FIA Determination of Lactate in Beer Samples. *J. Braz. Chem. Soc.* **2008**, *19* (4), pp 637-642.
116. Rahman, M.M. Fabrication of L-lactate biosensor based on redox species mediated lactate oxidase using micro-device. *Int J Biol Med Res.* **2010**, *1* (3), pp 9-14.
117. Weigelt, D. Enzyme Sensor for the Determination of Lactate and Lactate Dehydrogenase Activity. *Analyst* **1987**, *112*, pp 1155-1158.
118. Kulys, J.; Wang, L.; Maksimoviene, A. L-Lactate oxidase electrode based on methylene green and carbon paste. *Anal. Chem. Acta* **1993**, *274*, pp 53-58.
119. Taurino, I.; Reiss, R.; Richter, M.; Fairhead, M.; Thony-Meyer, L.; de Micheli, G.; Carrara, S. Comparative study of three lactate oxidases from *Aerococcus viridans* for biosensing applications. *Sens Electrochimica Acta* **2013**, *93*, pp 72-79.

120. Ricci, F.; Palleschi, G. Sensor and biosensor preparation, optimization and applications of Prussian blue modified electrodes. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *21*, pp 389-407.
121. Chu, Z.; Shi, L.; Zhang, Y.; Jin, W.; Warren, S.; Ward, D.; Dempsey, E. Single layer Prussian blue grid as a versatile enzyme trap for low-potential biosensors. *J. Mat. Chem.* **2012**, *22*, pp 14874-79.
122. Hirst, N.; Hazelwood, L.; Jayne, D.; Millner, P. An amperometric lactate biosensor using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduction via a Prussian Blue impregnated poly(ethyleneimine) surface on screenprinted carbon electrodes to detect anastomotic leak and sepsis. *Sens. Actuators B* **2013**, *186*, pp 674-680.
123. Zanini, V.P.; de Mishima, B.L.; Solis, V. An amperometric biosensor based on lactate oxidase immobilized in Laponite-chitosan hydrogel on a glassy carbon electrode. Application to the analysis of l-lactate in food samples. *Sens. Actuators B Chem.* **2012**, *155*, pp 75-80.
124. Kriz, K.; Kraft, L.; Krook, M.; Kriz, D. Amperometric Determination of l-Lactate Based on Entrapment of Lactate Oxidase on a Transducer Surface with a Semi-Permeable Membrane Using a SIRE Technology Based Biosensor. Application: Tomato Paste and Baby Food. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50* (12), pp 3419-3424.
125. Hasebe, Y.; Gu, T.; Fueki, T. Lactate biosensor based on coupled lactate oxidase/peroxidase system incorporated into the DNA/poly(allylamine) polyelectrolyte membrane. *Sensor Letters* **2005**, *3* (4), pp 304-308.
126. Chaubey, A.; Pande, K.; Singh, V.; Malhotra, B. Co-immobilization of lactate oxidase and lactate dehydrogenase on conducting polyaniline films. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *407*, pp 97-103.

127. Racek, J.; Musil, J. Biosensor for lactate determination in biological fluids. I. Construction and properties of the biosensor. *Clinica Chimica Acta* **1987**, *162* (2), pp 129-139.
128. Staskeviciene, S.L.; Cenas, N.K.; Kulys, J.J. Reagentless lactate electrodes based on electrocatalytic oxidation of flavocytochrome  $b_2$ . *Anal. Chim. Acta* **1991**, *243*, pp 167-171.
129. Kulys, J.; Wang, L.; Razumas, V. Sensitive yeast bioelectrode to L-lactate. *Electroanalysis* **1992**, *4*, pp 527-532.
130. Garjonyte, R.; Malinauskas, A. Investigation of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*- and mediator-based carbon paste electrodes as amperometric biosensors for lactic acid. *Sens. Actuators B Chem.* **2003**, *96* (3), pp 509-515.
131. Garjonyte, R.; Melvydas, V.; Malinauskas, A. Mediated amperometric biosensors for lactic acid based on carbon paste electrodes modified with baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioelectrochemistry* **2006**, *68* (2), pp 191-196.
132. Garjonyte, R.; Melvydas, V.; Malinauskas, A. Effect of yeast pretreatment on the characteristics of yeast-modified electrodes as mediated amperometric biosensors for lactic acid. *Bioelectrochemistry* **2008**, *74* (1) pp 188-194.
133. Amine, A.; Deni, J.; Kaufmann, J.M. Amperometric biosensor based on carbon paste mixed with enzyme, lipid and cytochrome *c*. *Bioelectrochem.* **1994**, *34*, pp 123-128.
134. Pohanka, M.; Zbooil, P. Amperometric Biosensor for D-Lactate Assay. *Food Technology & Biotechnology* **2008**, *46* (1), pp 107-110.
135. Vu, L.V.; Long, N.N.; Doanh, S.C. Preparation of silver nanoparticles by pulse sonoelectrochemical method and studying their characteristics. *J. Phys. Conf. Ser.* **2009**, *187*, pp 1-9.

136. Вегера, А.В.; Зимон, А.Д. Синтез и физико-химические свойства наночастиц серебра, стабилизированных желатином. *Журн. прикл. химии* **2006**, *79*, сс 1419-1422.
137. Cade, N.I.; Ritman-Meer, T.; Kwakwa, K.A. The plasmonic engineering of metal nanoparticles for enhanced fluorescence and Raman scattering. *Nanotechnol.* **2009**, *20*, pp 1-7.
138. Nesakumar, N.; Thandavan, K.; Sethuraman, S.; Krishnan, U.M.; Rayappan, J.B.B. An electrochemical biosensor with nanointerface for lactate detection based on lactate dehydrogenase immobilized on zinc oxide nanorods. *Journal of Colloid and Interface Science* **2014**, *414*, pp 90-96.
139. Teymourian, H.; Salimi, A.; Hallaj, R. Low potential detection of NADH based on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles/multiwalled carbon nanotubes composite: Fabrication of integrated dehydrogenase-based lactate biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* **2012**, *33* (1), pp 60-68.
140. Jena, B.K.; Raj, C.R. Amperometric L-Lactate Biosensor Based on Gold Nanoparticles. *Electroanalysis* **2007**, *19*, pp 816-822.
141. Nesakumar, N.; Sethuraman, S.; Krishnan, U.M.; Rayappan, J.B. Fabrication of lactate biosensor based on lactate dehydrogenase immobilized on cerium oxide nanoparticles. *J Colloid Interface Sci.* **2013**, *410*, pp 158-164.
142. Azzouzi, S.; Rotariu, L.; Benito, A.M.; Maser, W.K.; Ben Ali, M.; Bala, C. A novel amperometric biosensor based on gold nanoparticles anchored on reduced graphene oxide for sensitive detection of l-lactate tumor biomarker. *Biosens Bioelectron.* **2015**, *69*, pp 280-286.

143. Batra, B.; Narwal, V.; Pundir, C.S. An amperometric lactate biosensor based on lactate dehydrogenase immobilized onto graphene oxide nanoparticles-modified pencil graphite electrode. *Engineering in Life Sciences* **2016**, *16* (8), pp 786-794.
144. Briones, M.; Casero, E.; Vazquez, L.; Pariente, F.; Lorenzo, E.; Dominguez, M.D.P. Diamond nanoparticles as a way to improve electron transfer in sol-gel L-lactate biosensing platforms. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *908*, pp 141-149.
145. Cui, X.; Li, C.M.; Zang, J.; Yu, S. Highly sensitive lactate biosensor by engineering chitosan/PVI-Os/CNT/LOD network nanocomposite. *Biosens Bioelectron.* **2007**, *22* (12), pp 3288-3292.
146. Hernández-Ibáñez, N.; García-Cruz, L.; Montiel, V.; Foster, C.W.; Banks, C.E.; Iniesta, J. Electrochemical lactate biosensor based upon chitosan/carbon nanotubes modified screen-printed graphite electrodes for the determination of lactate in embryonic cell cultures. *Biosens Bioelectron.* **2016**, *77*, pp 1168-1174.
147. Huang, J.; Li, J.; Yang, Y.; Wang, X.; Wu, B.; Anzai, J.; Osa, T.; Chen, Q. Development of an amperometric L-lactate biosensor based on L-lactate oxidase immobilized through silica sol-gel film on multi-walled carbon nanotubes/platinum nanoparticle modified glassy carbon electrode. *Materials Science and Engineering C* **2008**, *28* (7), pp 1070-1075.
148. Suman, S.; Singhal, R.; Sharma, A.L.; Malthotra, B.D.; Pundir, C.S. Development of a lactate biosensor based on conducting copolymer bound lactate oxidase. *Sens. Actuators B Chem.* **2005**, *107* (2), pp 768-772.
149. Lamas-Ardisana, P.J.; Loaiza, O.A.; Añorga, L.; Jubete, E.; Borghei, M.; Ruiz, V.; Ochoteco, E.; Cabañero, G.; Grande, H.J. Disposable amperometric biosensor based on lactate oxidase immobilised on platinum nanoparticle-decorated carbon

- nanofiber and poly(diallyldimethylammonium chloride) films. *Biosens Bioelectron.* **2014**, *56*, pp 345-351.
150. Faber, K.; Haima, P.; Harder, W.; Veenhuis, M.; AB, G. Highly-efficient electrotransformation of the yeast *Hansenula polymorpha*. *Curr. Genet.* **1994**, *25* (4), pp 305-310.
151. Sohn, J.H.; Choi, E.S.; Kang, H.A.; Rhee, J.S.; Agaphonov, M.O.; Ter-Avanesyan, M.D.; Rhee, S.K. A dominant selection system designed for copy-number-controlled gene integration in *Hansenula polymorpha* DL-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *51*, pp 800-807.
152. Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K., Eds. *Current Protocols in Molecular Biology*; Greene Publishing Association at Wiley Interscience: New York, **1990**, 1-2.
153. Шавловский, Г.М.; Жарова, В.П.; Щелокова, И.Ф.; Трач, В.М.; Сибирный, А.А.; Кшеминская, Г.П. Флавиногенная активность природных штаммов дрожжей *Pichia guilliermondii*. *Прикл. биохимия и микробиол.* **1978**, *14*, сс 184-189.
154. Mauersberger, S.; Ohkuma, M.; Schunck, W.H. *Candida maltosa*. In *Non Conventional yeasts in biotechnology*; Wolf, K., Ed., Springer: Berlin, **1996**, pp 411-580.
155. Wach, A.; Pick, H.; Philippsen, P. Procedures for isolating yeast DNA for different purposes. In *Molecular genetics of yeast. A practical approach*; Johnston, J.R., Ed., IRL Press: Oxford, **1994**, pp 1-16.
156. Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory: New York, **2012**, *4*, pp 2028.



157. Gregg, C.; Kyryakov, P.; Titorenko, V.I. Purification of mitochondria from yeast cells. *Journal of visualized experiments* **2009**, *30*, pp 1417-1420.
158. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein determination with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, pp 265-275.
159. Appleby, C.A.; Morton, R.K. Lactic dehydrogenase and cytochrome  $b_2$  of baker's yeast. The deoxyribose polynucleotide component and the physicochemical properties of the crystalline enzyme. *Biochem J.* **1960**, *75* (2), pp 258-269.
160. Gonchar, M.; Maidan, M.; Korpan, Y.; Sibirny, V.; Kotylak, Z.; Sibirny, A. Metabolically engineered methylotrophic yeast cells and enzymes as sensor biorecognition elements. *FEMS Yeast Res.* **2002**, *2*, pp 307-314.
161. Schon, R. A Simple and Sensitive Enzymatic Method for the Determination of L-(+)-Lactic Acid. *Anal. Biochem.* **1965**, *12*, pp 413.
162. Ornstein, L.; Davis, B.J. Disc electrophoresis. I. background and theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1964**, *121*, pp 321-403.
163. Кулис, Ю.В.; Швирмицкас, Г.Ю.С.; Антанавичус, В.С., Вайткявичюс Р.К. Ингибирование цитохрома  $b_2$  акриламидом. *Биохимия* **1982**, *47* (4), сс 582-586.
164. Gaida, G.Z.; Stel'mashchuk, S.Ya., Smutok, O.V., Gonchar, M.V. A New Method of Visualization of the Enzymatic Activity of Flavocytochrome  $b_2$  in Electrophoretograms. *Appl. Biochem. Microbiol. (Moscow)* **2003**, *39* (2), pp 221-223.
165. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227* (5259), pp 680-685.

166. Ngounou, B.; Neugebauer, S.; Frodl, A.; Reiter, S.; Schuhmann, W. Combinatorial synthesis of a library of acrylic acid-based polymers and their evaluation as immobilisation matrix for amperometric biosensors. *Electrochim. Acta* **2004**, *49*, pp 3855-3863.
167. Reiter, S.; Ruhlig, D.; Ngounou, B.; Neugebauer, S.; Janiak, S., Vilkanauskyte, A.; Erichsen, T.; Schuhmann, W. An Electrochemical Robotic System for the Optimization of Amperometric Glucose biosensors Based on a library of Cathodic Electrodeposition Paints. *Macromol. Rapid Commun.* **2004**, *25*, pp 348-354.
168. Ballesteros Katemann, B.; Shulte, A.; Schuhmann, W. Constant-distance mode scanning electrochemical microscopy (SECM)--Part I: Adaptation of a non-optical shear-force-based positioning mode for SECM tips. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9* (9), pp 2025-2033.
169. Kranz, C.; Wittstock, G.; Wohlschläger, H.; Schuhmann, W. Imaging of microstructured biochemically active surfaces by means of scanning electrochemical microscopy. *Electrochimica Acta* **1997**, *42* (20-22), pp 3105-3111.
170. Karnicka, K.; Eckhard, K.; Guschin, D.A.; Stoica, L.; Kulesza, P.J.; Schuhmann, W. Visualisation of the local bio-electrocatalytic activity in biofuel cell cathodes by means of redox competition scanning electrochemical microscopy (RC-SECM). *Electrochemistry Communications* **2007**, *9* (8), pp 1998-2002.
171. Sun, X.P.; Zhang, Z.L.; Zhang, B.L.; Dong, X.D.; Dong, S.J.; Wang, E.K. Preparation of gold nanoparticles protected with polyelectrolyte. *Chin. Chem. Lett.* **2003**, *14* (8), pp 866-869.
172. Panda, B.R.; Chattopadhyay, A. Synthesis of Au nanoparticles at "all" pH by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduction of HAuCl<sub>4</sub>. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2007**, *7*, pp 1911-1915.

173. Gonchar, M.; Smutok, O.; Karkovska, M.; Stasyuk, N.; Gayda, G. Yeast-Based Biosensors for Clinical Diagnostics and Food Control. In *Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi*; Sibirny A.A., Ed., Springer: Berlin, **2017**, pp 391-412.
174. Gonchar, M.V.; Maidan, M.M.; Moroz, O.M.; Woodward, J.R.; Sibirny, A.A. Microbial O<sub>2</sub> - and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-electrode sensors for alcohol assays based on the use of permeabilized mutant yeast cells as the sensitive bioelements. *Biosens. Bioelectron.* **1998**, *13*, pp 945-952.
175. Stasyk, O.V.; Moroz, O.M.; Maidan, M.M.; Stasyk, O.G.; Kulachkovsky, A.R.; Gonchar, M.V.; Cregg, J.M.; Sibirny, A.A. Mutants of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* deficient in glucose repression as hosts for production of alcohol oxidase and heterologous proteins. *Book of Abstracts of the Tenth International Symposium on Yeasts "The Rising Power of Yeasts in Science and Industry"*. Papendal, Arnhem (The Netherlands). **2000**, p 159.
176. Lopes, T.S.; Klootwijk, J.; Veenstra, A.E.; van der Aar, P.C.; van Heerikhuizen, H.; Raúe, H.A.; Planta, R.J. High-copy-number integration into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*: a new vector for high-level expression. *Gene* **1989**, *79*, pp 199-206.
177. Parekh, R.N.; Shaw, M.R.; Wittrup, K.D. An integration vector for tunable, high copy, stable integration into the dispersed Ty  $\delta$  sites of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Prog.* **1996**, *12*, pp 16-21.
178. The *Hansenula polymorpha* genome database. <http://genome.jgi-psf.org/Hanpo2/Hanpo2.home.html>
179. Smutok, O.V.; Os'mak, G.S.; Gaida, G.Z.; Gonchar, M.V. Screening of yeasts producing stable L-lactate cytochrome *c* oxidoreductase and study of the regulation of enzyme synthesis. *Microbiology (Moscow)* **2006**, *75* (1), pp 20-24.

180. Майдан, М. Розробка клітинних біоелементів сенсорів та ферментативних методів для аналізу метанолу, етанолу та формальдегіду. Дисертація канд. наук, Від-ня регулятор. систем клітини Ін-ту біохімії ім. О. В. Палладіна, **1998**.
181. 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**, *125*, pp 227-232.
182. Reed, D.W.; Hartzell, P.L. The *Archaeoglobus fulgidus* D-lactate dehydrogenase is a Zn(2+) flavoprotein. *J Bacteriol.* **1999**, *181* (24), pp 7580-7587.
183. Smutok, O.; Dmytruk, K.; Gonchar, M.; Sibirny, A.; Schuhmann, W. Permeabilized cells of flavocytochrome *b<sub>2</sub>* over-producing recombinant yeast *Hansenula polymorpha* as biological recognition element in amperometric lactate biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *23* (5), pp 599-605.
184. Dmytruk, K.V.; Smutok, O.V.; Gonchar, M.V.; Sibirny, A.A. Construction of flavocytochrome *b<sub>2</sub>*-overproducing strains of the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*). *Microbiology (Moscow)* **2008**, *77* (2), pp 213-218.
185. 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**, *11*, pp 58-66.
186. Смуток, О.В.; Карковська, М.І.; Прокопів, Т.М.; Гончар, М.В. Оптимізація синтезу та розробка схеми очистки D-лактат : цитохром *c* оксидоредуктази рекомбінантного штама дріжджів *Ogatea (Hansenula) polymorpha* «tr6». *Біологічні Студії / Studia Biologica* **2018**, *12* (1), сс 5-16.

187. Смуток, О.; Карковська, М.; Стасюк, Н.; Гончар, М. Виділення, очистка, стабілізація та характеристика флавоцитохрому  $b_2$  із клітин надпродуцента *Ogatea polymorpha* «tr1» (*gcr1 catX CYB2*). *Вісник Львівського університету, Серія біологічна* **2018**, 77, сс 3-15.
188. Singer, T.P.; Kearney, E.B.; Gregolin, C.; Voeri, E.; Rippa, M. *Biochem. Biophys. Research Commun* **1960**, 3, pp 428.
189. Остапченко, Л.І.; Михайлик, І.В., Ред. *Біологічні мембрани: методи дослідження структури та функцій*; Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет": Київ, **2006**.
190. 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. *BMC Biotechnol.* **2007**, 7 (1), pp 33-40.
191. Lesanavičius, M.; Smutok, O.; Valiauga, B.; Marozienė, A.; Gonchar, M.; Krikštopaitis, K.; Čėnas, N. Kinetic properties of flavocytochrome  $b_2$  from *Hansenula polymorpha*. *Chemija* **2016**, 27 (2), pp 123-127.
192. Химический факультет МГУ.  
<http://www.chem.msu.su/rus/teaching/stereo/iii.html>
193. Мир науки. <http://worldofscience.ru/himija/194-racematy.html>
194. Oikawa, T.; Mukoyama, S.; Soda, K. Chemo-enzymatic D-enantiomerization of DL-lactate. *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, 73 (1), pp 80-82.
195. Buchner, E.; Schottenhammer, K. *Ber. Deut. Chem. Ges.* **1920**, 53, pp 865.

196. 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**, *153* (34), pp 138-144.
197. Karkovska, M.; Smutok, O.; Gonchar, M. Laboratory prototype of bioreactor for oxidation of toxic D-lactate using yeast cells overproducing D-lactate cytochrome *c* oxidoreductase. *BioMed Research International* [Online] **2016**, *2016*, Article ID 4652876, 5 pp. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4652876> (accessed June 7, 2016).
198. Terry, L.A., Ed. *Health-promoting Properties of Fruits and Vegetables*; CAB Intl: Cambridge, **2010**.
199. Zaydan, R.; Dion, M.; Boujtita, M. Development of a new method, based on a bioreactor coupled with an L-lactate biosensor, toward the determination of a nonspecific inhibition of L-lactic acid production during milk fermentation. *Fr. Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52* (1), pp 8-14.
200. Gonchar, M.; Smutok, O.; Os'mak, H. (Institute of cell biology NAS of Ukraine) Flavocytochrome *b*<sub>2</sub>-based enzymatic composition, method and kit for L-lactate. U.S. Patent WO/2009/009656. <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?WO=2009009656>, Sep. 15, 2009.
201. Гончар, М.В.; Смуток, О.В.; Осьмак, Г.С. (Інститут біології клітини НАН України) Спосіб кількісного визначення вмісту L-лактату у продуктах харчування та біологічних рідинах. Патент на корисну модель України 45283, Лист. 10, 2009.
202. Shimojo, N.; Fujino, K.; Kitahashi, S.; Naka, M.; Naka, K.; Okuda, K. Lactate analyzer with continuous blood sampling for monitoring blood lactate during physical exercise. *Clin Chem.* **1991**, *37* (11), pp 1978-1980.

203. Faridnia, M.H.; Palleschi, G.; Lubrano, G.J.; Guilbault, G.G. Amperometric biosensor for determination of lactate in sweat. *Anal. Chim. Acta* **1993**, *278* (1), pp 35-40.
204. Biagi, S.; Ghimenti, S.; Onor, M.; Bramanti, E. Simultaneous determination of lactate and pyruvate in human sweat using reversed-phase high-performance liquid chromatography: a noninvasive approach. *Biomed Chromatogr.* **2012**, *26* (11), pp 1408-1415.
205. Mitsubayashi, K.; Suzuki, M.; Tamiya, E.; Karube, I. Analysis of metabolites in sweat as a measure of physical condition. *Anal. Chim. Acta* **1994**, *289* (1), pp 27-34.
206. Derbyshire, P.J.; Barr, H.; Davis, F.; Higson, S.P. Lactate in human sweat: A critical review of research to the present day. *J. Physiol. Sci.* **2012**, *62* (6), pp 429-440.
207. Schabmueller, C.G.; Loppow, D.; Piechotta, G.; Schütze, B.; Albers, J.; Hintsche, R. Micromachined sensor for lactate monitoring in saliva. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21* (9), pp 1770-1776.
208. Marrazza, G.; Cagnini, A.; Mascini, M. l- and d-Lactate assay in real milk samples with immobilized enzyme reactors and graphite electrode. *Talanta* **1994**, *41* (6), pp 1007-1014.
209. 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**, *72*, сс 25-32.
210. Fukushima, T.; Adachi, S.; Ichihara, H.; Al-Kindy, S.; Imai K. Fluorimetric determination of D- and L-lactate derivatized with 4-(N, N-

- dimethylaminosulfonyl)-7-piperazino-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-PZ) by high-performance liquid chromatography. *Japan Biomedical chromatography* **1999**, *13* (6), pp 418-424.
211. Compagnone, D.; Mosca, A.; Palleschi, G. Cyclic enzymic determination of L-lactate by differential pH measurement. *Anal. Lett.* **1995**, *28* (14), pp 2475-2490.
212. Iwuoha, E.I.; Rock, A.; Smyth, M.R. Amperometric L-lactate biosensors. Part 1. Lactic acid sensing electrode containing lactate oxidase in a composite poly-L-lysine matrix. *Electroanalysis* **1999**, *11* (5), pp 367-373.
213. Adamowicz, E.; Burstein, C. L-Lactate enzyme electrode obtained with immobilized respiratory chain from *Escherichia coli* and oxygen probe for specific determination of L-lactate in yogurt, wine and blood. *Biosensors* **1987**, *3* (1), pp 27-43.
214. Palleschi, G.; Volpe, G.; Compagnone, D.; La Notte, E.; Esti, M. Bioelectrochemical determination of lactic and malic acids in wine. *Talanta* **1994**, *41* (6), pp 917-923.
215. Madaras, M.B.; Buck, R.P. Miniaturized biosensors employing electropolymerized permselective films and their use for creatine assays in human serum. *Anal Chem.* **1996**, *68* (21), pp 3832-3839.
216. Serra, B.; Reviejo, A.J.; Parrado, C.; Pingarron, J.M. Graphite-Teflon composite bienzyme electrodes for the determination of L-lactate: application to food samples. *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14* (5), pp 505-513.
217. Smutok, O.; Gayda, G.; Gonchar, M.; Schuhmann, W. A novel L-lactate-selective biosensor based on flavocytochrome  $b_2$  from methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20* (7), pp 1285-1290.



218. Schuhmann, W.; Wohlschläger, H.; Huber, J.; Schmidt, H.; Stadler, H. Development of an extremely flexible automatic analyzer with integrated biosensors for on-line control of fermentation processes. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *315* (1-2), pp 113-122.
219. Erichen, T.; Janiak, S.; Alpeeva, I.; Smutok O.; Schuhmann, W. On-line kontrolle von wein fermentations pozessen mittels eines automatischen analysators mit integrierten reagenzlosen biosensoren. *Book of Abstracts, Anwendererfahrungen Weinanalytik*, **2005**, p 13.
220. 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<sub>2</sub>. *Bioelectrochemistry* **2009**, *76* (1-2), pp 175-179.
221. 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**, *76* (4), pp 837-46.
222. Gomes, A.; Fernandes, E.; Lima, J.L. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J Biochem Biophys Methods* **2005**, *65* (2-3), pp 45-80.
223. Koch, A.; Yoon, Y.; Bonekamp, N.A.; McNiven, M.A.; Schrader, M. A role for Fis1 in both mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell.* **2005**, *16* (11), pp 5077-5086.
224. Rodriguez-Gonzalez, B.; Burrows, A.; Watanabe, M.; Kiely, C.J.; Liz Marzan, L.M. Multishell bimetallic AuAg nanoparticles: synthesis, structure and optical properties. *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, pp 1755-1759.

225. Bohren, C.; Huffman, D. Eds. *Absorption and scattering of light by small particles*; Wiley: New York, **1983**.
226. Stasyuk, N.; Serkiz, R.; Mudry, S.; Gayda, G.; Zakalskiy, A.; Koval'chuk, Y.; Gonchar, M. Recombinant human arginase I immobilized on gold and silver nanoparticles: preparation and properties. *Nanotechnology Development* **2011**, *1*, pp 11-15.
227. Roberts, W.S.; Lonsdale, D.J.; Griffiths, J.; Higson, S.P. Advances in the application of scanning electrochemical microscopy to bioanalytical systems. *Biosens Bioelectron.* **2007**, *23* (3), pp 301-318.
228. Zhao, C.; Wittstock, G. Scanning electrochemical microscopy for detection of biosensor and biochip surfaces with immobilized pyrroloquinoline quinone (PQQ)-dependent glucose dehydrogenase as enzyme label. *Biosens Bioelectron.* **2005**, *20* (7), pp 1277-1284.
229. Schäfer, D.; Maciejewska, M.; Schuhmann, W. SECM visualization of spatial variability of enzyme-polymer spots. 1. Discretisation and interference elimination using artificial neural networks. *Biosens Bioelectron.* **2007**, *22* (9-10), pp 1887-1895.
230. 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**, *144*, pp 1195-1200.
231. Sigawi, S.; Smutok, O.; Demkiv, O.; Gayda, G.; Vus, B.; Nitzan, Ye.; Gonchar, M.; Nisnevitch, M. Detection of Waterborne and Airborne Formaldehyde: From Amperometric Chemosensing to a Visual Biosensor Based on Alcohol Oxidase. *Materials* **2014**, *7* (2), pp 1055-1068.

232. Jia, W.; Bandothkar, A.J.; Valdés-Ramírez, G.; Windmiller, J.R.; Yang, Z.; Ramírez, J.; Chan, G.; Wang, J. Electrochemical tattoo biosensors for real-time noninvasive lactate monitoring in human perspiration. *Anal Chem.* **2013**, 85 (14), pp 6553-6560.
233. Bijman, J.; Quinton, P.M. Lactate and bicarbonate uptake in the sweat duct of cystic fibrosis and normal subjects. *Pediatr Res.* **1987**, 21 (1), pp 79-82.
234. 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. In *Nowoczesne metody analizy surowców rolniczych*; Puchalskiego, C.; Bartosza G., Reds.; Uniwersytet Rzeszowski: Rzeszów, **2011**, ss 241-253.
235. Gayda, G.Z.; Demkiv, O.M.; Stasyuk, N.Ye.; Serkiz, R.Ya.; Lootsik, M.D.; Errachid, A.; Gonchar, M.V.; Nisnevitch, M. Metallic Nanoparticles Obtained via “Green” Synthesis as a Platform for Biosensor Construction. *Appl. Sci.* **2019**, 9 (4), pp 1-16.
236. Goriushkina, T.B.; Orlova, A.P.; Smutok, O.V.; Gonchar, M.V.; Soldatkin, A.P.; Dzyadevych, S.V. Application of L-lactate–cytochrome *c*–oxidoreductase for development of amperometric biosensor for lactate determination. *Biopolymers and Cells* **2009**, 25 (3), pp 194-203.
237. Smutok, O.; Broda, D.; Smutok, H.; Dmytruk, K.; Gonchar, M. Chromate reducing activity of the *Hansenula polymorpha* recombinant cells overproducing flavocytochrome *b<sub>2</sub>*. *Chemosphere* **2011**, 83 (4), pp 449-454.
238. 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. In *Biosensors - Emerging Materials and Applications*; Serra P.A., Ed.; InTech: Rijeka, **2011**, pp 401-446.
239. Stasyuk, N.; Smutok, O.; Zakalskiy, A.; Zakalska, O.; Gonchar, M. Methylamine-sensitive amperometric biosensor based on (His)<sub>6</sub>-tagged *Hansenula polymorpha* methylamine oxidase immobilized on the gold nanoparticles. *BioMed Research International* [Online] **2014**, 2014, Article ID 480498, 8 pp. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/480498> (accessed July 16, 2014).
240. Karkovska, M.; Smutok, O.; Dmytruk, K.; Gonchar, M. Yeast flavocytochrome *b*<sub>2</sub> as a perspective tool in bioreduction and detection of chromate. In *Living Organisms and Bioanalytical Approaches for Detoxification and Monitoring of Toxic Compounds*; Sibirny, A.; Fedorovych, D.; Gonchar, M.; Grabek-Lejko, D., Eds.; University of Rzeszow: Rzeszów, **2015**, pp 113-123.
241. Smutok, O.; Karkovska, M.; Serkiz, Ya.; Vus, B.; Čenas, N.; Gonchar, M. Development of a new mediatorless biosensor based on flavocytochrome *b*<sub>2</sub> immobilized onto gold nanolayer for non-invasive L-lactate analysis of human liquids. *Sensor & Actuators B* **2017**, 250, pp 469-475.
242. Карковська, М.І.; Стасюк, Н.Є.; Гайда, Г.З.; Смуток, О.В.; Гончар, М.В. Наноматеріали у конструюванні біосенсорів біомедичного призначення. У *Багатофункціональні наноматеріали для біології та медицини: молекулярний дизайн, синтез і застосування*; Стойка, Р.С., Ред.; Наукова Думка: Київ, **2017**, с 165-177.
243. 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* [Online] **2018**, 2018, 8 pp. <https://doi.org/10.1002/yea.3372> (accessed Nov 29, 2018).

244. Gonchar, M.V.; Maidan, M.M.; Pavlishko, H.M.; Sibirny, A.A. A new oxidase-peroxidase kit for ethanol assays in alcoholic beverages”. *Food Technol. Biotechnol.* **2001**, 39 (1), pp 37-42.
245. EKF diagnostics. <https://www.ekfdiagnostics.com/biosen-analyzer.html>
246. Nova Bio. <http://www.novabio.us/2019/statstrip-lactate/index.php>
247. Apexbio.  
<https://www.apexbio.com/Web/Products/content.php?product=AS60000F3>

## Додаток 1

### Список наукових праць здобувача:

#### 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.
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 // **BMC Biotechnol.** – 2007. – V. 7, N 1. – P. 33.
3. Dmytruk KV, Smutok OV, Gonchar MV, Sibirny 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.
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. .
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.

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.
7. **Smutok** O., Broda D., Smutok H., Dmytruk K., Gonchar M. Chromate reducing activity of the *Hansenula polymorpha* recombinant cells overproducing flavocytochrome *b*<sub>2</sub>// **Chemosphere** – 2011. – V. 83, N 4. – P. 449–454.
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.
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.
10. Smutok O., Karkovska M., Smutok H., Gonchar M. Flavocytochrome *b*<sub>2</sub>-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>.
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**).
12. Stasyuk N., **Smutok** O., Zakalskiy A., Zakalska O., Gonchar M. Methylamine-sensitive amperometric biosensor based on (His)<sub>6</sub>-tagged *Hansenula polymorpha*

- methylamine oxidase immobilized on the gold nanoparticles // **BioMed Research International**. – 2014. – V. 2014. Article ID 480498. – P. 8.
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.
  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.
  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>.
  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.
  17. **Smutok O.**, Karkovska M., Serkiz Ya., Vus B., Čėnas 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.
  18. О. В. **Смуток**, М. І. Карковська, Т. М. Прокопів, М.В. Гончар. «Оптимізація синтезу та розробка схеми очистки D-лактат : цитохром  $c$  оксидоредуктази рекомбінантного штама дріжджів *Ogatea (Hansenula) polymorpha* «tr6» // Біологічні Студії // **Studia Biologica** – 2018. – Т. 12, N 1. – С. 5–16.
  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.

20. **Smutok** O., Karkovska M., Prokopiv T., Kavetsky 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>.

#### 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.
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.
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.
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.

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.

#### **Патенти:**

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>.
27. Гончар М.В., **Смуток О.В.**, Осмак 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.

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

24. 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.
25. **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.

26. 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.
27. **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.
28. **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.
29. 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.
30. 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.

31. 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.
32. **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.
33. Gonchar M., Karkovska M., Stasyuk N., **Smutok O.** Gene and Protein Engineering in Production of the Enzymes of Analytical Importance // *27<sup>th</sup> International conference on yeast genetics and molecular biology*. Levico Terme, Italy, September 6–12, 2015, Abstract book. – P. 153.
34. 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.
35. 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.
36. 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.

37. 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.
38. 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.
39. **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.
40. 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.
41. 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.
42. **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*<sub>2</sub> 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.

43. **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
44. **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.
45. **Smutok** O., Karkovska M., Stasyuk N., Gonchar M. Isolation, purification, stabilization and characterisation of flavocytochrome *b<sub>2</sub>* 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.
46. 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.