Облікова картка дисертації

I. Загальні відомості

Image not found or type unknow

Державний обліковий номер: 0519U000467

Особливі позначки: відкрита

Дата реєстрації: 14-06-2019

Статус: Захищена

Реквізити наказу МОН / наказу закладу:

II. Відомості про здобувача

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Смуток Олег Володимирович
2. Smutok Oleh V.

Кваліфікація: к. б. н., 03.00.07

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Вид дисертації: доктор наук

Аспірантура/Докторантура: ні

Шифр наукової спеціальності: 03.00.07

Назва наукової спеціальності: Мікробіологія

Галузь / галузі знань: Не застосовується

Освітньо-наукова програма зі спеціальності: Не застосовується

Дата захисту: 05-06-2019

Спеціальність за освітою: Генетика

Місце роботи здобувача: Інститут біології клітини

Код за ЄДРПОУ: 25255758

Місцезнаходження: Драгоманова 14/16, м. Львів, Львівська обл., 79005, Україна

Форма власності:

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

III. Відомості про організацію, де відбувся захист

Шифр спеціалізованої вченої ради (разової спеціалізованої вченої ради): Д 35.246.01

Повне найменування юридичної особи: Інститут біології клітини

Код за ЄДРПОУ: 25255758

Місцезнаходження: Драгоманова 14/16, м. Львів, Львівська обл., 79005, Україна

Форма власності:

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

IV. Відомості про підприємство, установу, організацію, в якій було виконано дисертацію

Повне найменування юридичної особи: Інститут біології клітини

Код за ЄДРПОУ: 25255758

Місцезнаходження: Драгоманова 14/16, м. Львів, Львівська обл., 79005, Україна

Форма власності:

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

V. Відомості про дисертацію

Мова дисертації:

Коди тематичних рубрик: 34.27

Тема дисертації:

1. 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

2. L- and D-lactate-selective oxidoreductases, recombinant yeast cells of Ogataea polymorpha and nanomaterials for the development of new enzymatic and biosensor approaches for the quantitative analysis of lactic acid

Реферат/анотація:

1. Дисертація присвячена конструюванню дріжджових штамів – надпродуцентів L- і D-лактат-селективних оксидоредуктаз, очищенню ферментів та розробці на їх основі, у поєднанні із нанорозмірними матеріалами, нових спектрофотометричних та біосенсорних методів визначення вмісту L- та D-лактату, а також біореакторів для ензиматичного отримання чистих енантіомерів молочної кислоти. За допомогою молекулярно-генетичних підходів сконструйовано рекомбінантні штами дріжджів Ogataea polymorpha: «tr1» (gcr1 catX CYB2) – надпродуцент L-лактат: ферицитохром с-оксидоредуктази (флавоцитохрому b2, ФЦ b2), що характеризується восьмикратним підвищенням питомої активності відповідного ферменту в безклітинних екстрактах. Сконструйовано також рекомбінантний продуцент D-лактат: ферицитохром с-оксидоредуктази (DLDH) O. polymorpha «tr6» (gcr1 catX CYB2Δ/DLD1), питома активність DLDH якого збільшується у шість

разів, порівняно з вихідними штамами, причому завдяки делеції гена CYB2 штам не синтезує ФЦ b2. Оптимізовано умови синтезу цільових ферментів для обох рекомбінантних штамів дріжджів. Уперше розроблено новий метод очищення ФЦ b2 із екстрактів клітин штаму дріжджів O. polymorpha «tr1» афінною хроматографією на амінопропілсилохромі, модифікованому цитохромом с в ролі ліганда та отримано препарати фермента із питомою активністю 10 Од.·мг-1. Опрацьовано схему очищення мембранного фермента DLDH із клітин штаму дріжджів O. polymorpha «tr6» та отримано очищений препарат із питомою активністю 1,1 Од.·мг-1. Для обох ферментних препаратів проведено фізико-хімічну та ензимологічну характеристику. Доведено можливість використання продуцентів L- та D-лактат-специфічних оксидоредуктаз для продукції чистого D-енантіомера із рацемату молочної кислоти та усунення D-лактату в модельних сумішах. Уперше розроблено новий ензиматично-фотометричний метод кількісного аналізу L-лактату за використання рекомбінантного ФЦ b2 та «Берлінської блакиті». Опрацьовано спосіб реутилізації фермента для визначення вмісту L-лактату за використання ФЦ b2, іммобілізованого на магнітних мікрочастинках. Розроблено новий фотометричний метод кількісного аналізу D-лактату на основі використання клітин та субклітинних фракцій O. polymorpha «tr6» та утворення формазану як кінцевого кольорового продукту. Синтезовано носії для іммобілізації ферментів на основі наночастинок золота. Розроблено новий метод формування золотих наночастинок на поверхні робочого планарного електроду in situ. За використання сканувальної електронної мікроскопії, рентгеноспектрального аналізу, атомно-силової мікроскопії та трансмісійної електронної мікроскопії проведено фізико-хімічну і структурну характеристику отриманих наноматеріалів. На основі пермеабілізованих клітин штаму-надпродуцента ФЦ b2 O. polymorpha «tr1» сконструйовано нові мікробні амперометричні біосенсори з покращеними біоаналітичними характеристиками. Розроблено новий ензимний безмедіаторний амперометричний біосенсор «третього покоління» на L-лактат на основі очищеного рекомбінантного ФЦ b2 та наночастинок золота. Розроблено та охарактеризовано нові мікробні 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 b2, мікробні біосенсори характеризуються високою селективністю до D-енантіомера лактату. Розроблені біоаналітичні підходи на основі рекомбінантних клітин, клітинних уламків та очищених ферментів використано для кількісного аналізу L- та D-лактату в реальних зразках рідин людини, харчових продуктів та фармацевтичних препаратів трансфузійного призначення. Завдяки високій чутливості та селективності, а також надійності та простоті у використанні, опрацьовані ензиматичні та мікробні підходи кількісного аналізу лактату можуть знайти практичне використання в клінічній діагностиці, спортивній медицині та харчових технологіях.

2. The thesis is devoted to construction of yeast strains overproducers of L- and D-lactate-selective oxidoreductases, purification of the enzymes, their combination with nanosized materials, and development on the base of obtained bionanomolecules new spectrophotometric and biosensor approaches for analysis of L- and D-lactate, as well as bioreactors for enzymatic conversion of racemic lactic acid to pure enantiomers. Using molecular genetics approaches, recombinant strain of yeast Ogataea polymorpha: "tr1" (gcr1 catX CYB2) – overproducer of L-lactate: ferricitohrome c-oxidoreductase (flavocytochrome b2, FC b2), characterized by an eight-fold increase in the specific activity of the enzyme, has been constructed. A recombinant producer of D-lactate: ferricitohrom c-oxidoreductase (DLDH) – O. polymorpha "tr6" (gcr1 catX CYB2Δ/DLD1), whose specific activity of DLDN is six-fold greater comparing with the parental strains, has been constructed also. Due to deletion of the CYB2 gene, the strain is not synthesizes FC b2. The conditions for the maximal enzymes synthesis for both recombinant yeast strains have been optimized. For the first time, a new method of purifying FC b2 from extracts of yeast strains O. polymorpha "tr1" by affinity chromatography on aminopropylsilocromes modified with cytochrome c in the role of a ligand has been developed, and preparations of the enzyme with a specific activity of 10 U·mg-1 have been obtained. The scheme of purification of the membrane enzyme DLDN from the cells of O. polymorpha "tr6" has been developed and a purified enzyme preparation with a specific activity of 1.1 U·mg-1 has been obtained. For both enzyme preparations, a physico-chemical and enzyme characteristic has been performed. The possibility of using the yeast producers of L- and D-lactate-specific oxidoreductases for production of pure

D-enantiomer from racemic lactic acid and remediation of D-lactate from the model samples has been proved. For the first time a new enzymatic-photometric method of quantitative analysis of L-lactate based on recombinant FC b2 and "Prussian blue" has been reported. The method of reusing of enzyme immobilized on ferromagnetic microparticles has been developed. It is shown that enzyme microparticles can be removed from the reaction solution by magnetic field and reused at least six times without loss of quality of L-lactate analysis. A new photometric method of quantitative analysis of D-lactate based on the use of cell and subcellular fractions of O. polymorpha "tr6" and the formation of formazan as a final colored product has been developed. The nanocarriers for immobilization of the enzymes based on gold nanoparticles were synthesized. A new method of gold nanoparticles formation on the surface of the working planar electrode in situ was developed. The physico-chemical and structural characteristics of the nanomaterials were performed by means scanning electron microscopy, X-ray spectral analysis, atomic force microscopy and transmitted electron microscopy. On the basis of permeabilized cells O. polymorpha "tr1" - overproduced FC b2 new microbial amperometric biosensors with improved bioanalytical characteristics have been constructed. The construction of new microbial ampereometric biosensors with improved bioanalytical characteristics based on permeabilized FC b2-overproductive cells of O. polymorpha "tr1" enriched with an enzyme bound gold nanoparticles have been done. For the first time it has been shown that the enrichment of yeast cells of FC b2, due to the overexpression of the corresponding gene and the addition of immobilized enzyme gold nanoparticles into cells, significantly improves the main operational characteristics of the biosensor (sensitivity, detection limit, storage stability, etc.). A new L-lactate-selective enzymatic mediatorless biosensor of the "third generation" based on purified recombinant FC b2 and gold nanoparticles has been developed. New microbial biosensors for D-lactate with the use of cell debris, subcellular fractions enriched with mitochondria, as well, the cells of recombinant strain O. polymorpha «tr6» have been developed and characterized. Due to the deletion of the CYB2 gene encoding L-lactate-selective flavocytochrome b2, microbial biosensors are highly selective to the D- lactate enantiomer. The developed bioanalytical approaches based on recombinant cells, cell debris, subcellular fractions enriched with mitochondria, as well, purified enzyme preparations were used for quantitative analysis of L- and D-lactate in the real samples of human liquids, food products and transfusion pharmaceuticals. Due to its high sensitivity and selectivity, as well as reliability and ease of use, the developed enzymatic and microbial approaches of quantitative analysis of lactate can be using practically in clinical diagnosis, sports medicine and food technology.

Державний реєстраційний номер ДіР:

Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки:

Стратегічний пріоритетний напрям інноваційної діяльності:

Підсумки дослідження:

Публікації:

Наукова (науково-технічна) продукція:

Соціально-економічна спрямованість:

Охоронні документи на ОПІВ:

Впровадження результатів дисертації:

Зв'язок з науковими темами:

VI. Відомості про наукового керівника/керівників (консультанта)

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Гончар Михайло Васильович

2. Gonchar Mykhailo V.

Кваліфікація: д. б. н., 03.00.07

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Гончар Михайло Васильович

2. Gonchar Mykhailo V.

Кваліфікація: д. б. н., 03.00.07

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

VII. Відомості про офіційних опонентів та рецензентів

Офіційні опоненти

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Іваниця Володимир Олексійович

2. Ivanytsia Volodymyr O.

Кваліфікація: д. б. н., 03.00.07

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Варбанець Людмила Дмитрівна

2. Varbanets Ludmyla D.

Кваліфікація: д. б. н., 03.00.07

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Осташ Богдан Омелянович

2. Ostash Bohdan O.

Кваліфікація: д. б. н., 03.00.22

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

Рецензенти

VIII. Заключні відомості

Власне Прізвище Ім'я По-батькові голови ради	Сибірний Андрій Андрійович
Власне Прізвище Ім'я По-батькові головуючого на засіданні	Сибірний Андрій Андрійович
Відповідальний за підготовку облікових документів	
Реєстратор	
Керівник відділу УкрІНТЕІ, що є відповідальним за реєстрацію наукової діяльності	Юрченко Т.А.