

ОКСИДАЗИ МІКРОСКОПІЧНИХ ГРИБІВ: СКРИНІНГ ШТАМІВ-ПРОДУЦЕНТІВ І ПЕРСПЕКТИВИ БІОАНАЛІТИЧНОГО ВИКОРИСТАННЯ

О. Демків¹, С. Банах², Г. Клепач³, Г. Гайда¹, О. Смуток¹, М. Гончар¹

¹Інститут біології клітини НАН України
вул. Драгоманова, 14/16, Львів 79005, Україна

²Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

³Дрогобицький державний педагогічний університет імені Івана Франка
вул. Шевченка, 23, Дрогобич 82100, Україна
e-mail: galina.gayda@gmail.com

Здійснено скринінг низки штамів мікроскопічних грибів на здатність до синтезу практично важливих оксидаз (галактозооксидази, гліцеролоксидази, метиламіноксидази та пероксидази). Відібрано ефективні штами роду *Botrytis* як потенційні продуценти гліцеролоксидази (ГО) та галактозооксидази (ГалО). Досліджено вплив різних джерел вуглецю й інших умов культивування на ефективність позаклітинного та внутрішньоклітинного накопичення ГО і ГалО. Розроблено оптимальну схему виділення й очищення ГО із клітин *B. allii*, яка включає колонкову хроматографію безклітинного екстракту на іонообмінному сорбенті DEAE–Тоуорearl 650M. Отримано препарат ГО з активністю 0,4 Од./мг білка (фактор очищення 16,6, вихід 65 %). Продемонстровано можливість конструювання амперометричного мікробного біосенсора на гліцерол за використання пермеабілізованих клітин штаму *B. allii* як біоселективного елемента. Максимальний відгук біосенсора на гліцерол 217 нА, константа Міхаеліса-Ментен 20 мМ. Виділений фермент і клітинний сенсор можуть бути перспективними для аналізу гліцеролу в реальних зразках.

Ключові слова: оксидази мікроскопічних грибів, скринінг продуцентів, *Botritis allii*, гліцеролоксидаза, аналіз гліцеролу.

Оксидази є найбільш конкурентоспроможними й економічно ефективними біокатализаторами багатьох природних і технологічних процесів, вони використовуються в медицині та промисловості як складові діагностичних наборів або біосенсорів. Перевагою оксидаз над іншими важливими для аналітичної практики ферментами є те, що оксидази здатні окислювати субстрати, не потребуючи при цьому додаткових ко-факторів. Продуктом таких реакцій є Гідрогену пероксид, який за наявності відповідних хромогенів за певних умов проведення реакції утворює забарвлені сполуки. Останні можна реєструвати кількісно (спектрофотометрично) або якісно (візуально).

Одним із практично важливих для аналітичної біотехнології ферментів є галактозооксидаза (ГалО, КФ 1.1.3.9). ГалО каталізує окиснення С6–гідроксильної групи з D–галактози, а також первинних спиртів до відповідних альдегідів, під час цього відбувається відновлення кисню до Гідрогену пероксиду. Фермент є стереоспецифічним у реакціях з цукром, але має широку субстратну специфічність і здатен редукувати первинні спирти [14, 15]. ГалО використовують у складі біосенсора для вимірювання концентрації галактози та її похідних у біологічних рідинах, для визначення лактози в молоці й молочних продуктах, у фармації та харчовій промисловості для перетворення D–галактози до харчових агентів [16]. ГалО секретують представники різних видів грибів, серед яких *Fusarium graminearum* є найбільш вивченим [15]. Гени, що відповідають за синтез ГалО, були клоновані й успіш-

но трансформовані в мікроскопічні гриби *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae* і *Fusarium venenatum*, а також у метилотрофні дріжджі *Pichia pastoris* і бактерії *Escherichia coli* [14, 15].

Іншим ферментом, перспективним для промисловості й медицини, але на даний час маловивченим, є гліцеролоксидаза (ГО) [1, 4, 19]. Гліцерол є одним із метаболітів спиртового бродіння, його широко використовують у виробництві косметичних засобів, синтетичних смол та вибухових речовин. Моніторинг гліцеролу є важливим у фармакології, харчовій промисловості, а також у клінічній діагностиці для контролю рівня триацилгліцеролів у крові [17]. Потенційними продуцентами ГО серед грибів є аскоміцети родів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Neurospora* та дейтероміцети роду *Botrytis* [1, 4, 10, 19]. На сьогодні діагностикумів за використання ГО, а також безпосередньо препаратів ферменту на міжнародному ринку біотехнологічних продуктів немає.

Пероксидаза (ПО) має важливе біоаналітичне значення та широко використовується в молекулярно-біологічних методиках, зокрема, як маркер у складі діагностикумів для імуноферментного аналізу [5]. ПО каталізує окислення субстратів органічної природи за допомогою Гідрогену пероксиду, який слугує акцептором протонів і електронів. Субстратами ПО є фенольні сполуки, поліфеноли у вільному стані або у формі складних сполук (глікозидів, дубильних речовин) і ароматичні аміни, діаміни, індофеноли, ароматичні амінокислоти, аскорбінова кислота, нітрати, НАДФН₂, Н₂О₂ завдяки своїм сильним окислювальним властивостям знайшов широке застосування у різних галузях промисловості (медична, хімічна, військова, металургійна, фармацевтична, харчова, косметична та ін.). У той же час Н₂О₂ є відходом виробництва, що забруднює навколишнє середовище [9]. Тому надійні методи моніторингу токсичного Н₂О₂ потрібні у фармацевтичних, клінічних та екологічних галузях досліджень.

Метиламінооксидаза (МАО) (КФ 1.4.3.21) – фермент, який індукується у метилотрофних дріжджів при рості на первинних алкілованих амінах як єдиному джерелі Нітрогену. МАО каталізує окислення первинних амінів до альдегідів (формальдегіду або ацетальдегіду), амонію та Гідрогену пероксиду [8]. Метиламін (МА) – найпростіший первинний амін, який інтенсивно використовується для виробництва важливих хімічних продуктів: фармацевтичних препаратів, пестицидів, добавок до пального, вибухових речовин, розчинників, миючих засобів, фотографічних реагентів, хімікатів для дублення шкіри і барвників [13]. Підвищений рівень біогенних амінів у навколишньому середовищі та біологічних рідинах людини може спричинити негативні наслідки для здоров'я, тому моніторинг їх є актуальним. Проблема досі не вирішена через брак швидких, дешевих і селективних методів аналізу. Найбільш перспективними для виявлення алкіламінів є ензиматичні методи, що базуються на природних ізоформах МАО з різною субстратною специфічністю [3, 6, 11, 18].

Таким чином, оксидази – надзвичайно важливі та необхідні ферменти, тому пошук і створення ефективних мікробних продуцентів, а також розробка нових ензиматичних методів аналізу за використання відповідних оксидаз є надзвичайно актуальною задачею. Основною перешкодою для розповсюдження та широкого застосування цих методів є відсутність комерційних препаратів (зокрема, ГО та МАО).

Метою роботи було провести скринінг мікроскопічних грибів як потенційних продуцентів деяких оксидаз; відібрати продуценти, яким характерна найвища активність цільового ензиму, та дослідити оптимальні умови їхнього культивування; розробити просту ефективну схему виділення й очищення оксидаз (на прикладі ГО); дослідити можливість використання найкращого продуцента ГО для аналізу гліцеролу.

Матеріали та методи

У роботі використовували такі штами мікроорганізмів: *Botrytis aclada*, *Botrytis allii*100(5), *Monilinia fruticola*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Totula* sp., *Stachybotris chartarum*, *Pichiapini*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma lignorum*, *Aspergillus glaucus*,

Trichothocium roseum, *Aureobasidium pullulans*, люб'язно надані з музеїв Інституту біології клітини НАН України, ЛНУ ім І. Франка та Жешувського університету (Польща).

Мікроорганізми вирощували в мінеральному середовищі такого складу (г/л): KNO_3 – 2,5; KH_2PO_4 – 2; NaCl – 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5; мінеральні елементи – 2 мл, дріжджовий екстракт – 0,2. Джерелом Карбону залежно від мети експерименту були (г/л): гліцерол – 20; глюкоза – 10; мальтоза – 10; галактоза – 10, за температури 20–25 °C або 28 °C у колбах об'ємом 500 мл на шейкері за постійної аерації (200 об./хв).

Отриману біомасу грибів відфільтровували й отримували безклітинний екстракт (БЕ), як описано раніше [1]. Аналіз активності оксидаз: ГО, ГалО, MAO та ПО проводили у БЕ та культуральній рідині (КР) досліджуваних штамів мікроорганізмів якісно (візуально) та кількісно оксидазно-пероксидазним методом (ОП-метод) за використання хромогенів – 0,3 мМ о-діазидину [2] або 5 мМ АБТС [12]. Концентрацію білка в БЕ визначали методом Лоурі.

Електрофоретичні дослідження білків у поліакриламідному гелі (ПААГ) здійснювали за нативних і денатуруючих умов на приладі VE-2M «Хелікон» (Москва).

При конструюванні біосенсора поверхню робочого електрода покривали чутливою мембраною, для цього використовували 5 мМ розчин менделового синього в 20 мМ фосфатному буфері (ФБ) рН 7,5, який осаджували за використання циклічної вольтамперометрії в діапазоні напруг від -400 до 400 мВ зі швидкістю сканування 50 мВ хв⁻¹ проти електрода порівняння Ag/AgCl/3 М КСl. Після електроосадження медіатора РЕ поміщали на 5-10 хв у 30 мМ ФБ, рН 7,5. На модифіковану поверхню РЕ наносили 3 мкл розчину ПО (200 Од. мл⁻¹), підсушували 10-15 хв при кімнатній температурі, додавали 3 мкл суспензії пермеабілізованих клітин, підсушували та фіксували діалізою плівкою.

Статистичне опрацювання результатів проводили з використанням програмних пакетів Microsoft Excel та Origin.

Результати і їхнє обговорення

Скринінг продуцентів оксидаз

З метою пошуку потенційних продуцентів оксидаз ГО, ГалО, ПО та MAO було здійснено скринінг штамів мікроскопічних грибів (табл. 1). Для цього клітини грибів вирощували за однакових умов у мінеральному середовищі з 1 % гліцеролом та 0,05 % дріжджовим екстрактом. Візуальний моніторинг активності оксидаз у БЕ (табл. 1) та КР проводили кожні 24 години ОП-методом за використання о-діанізидину протягом 4-х діб культивування.

Таблиця 1

Активність ферментів у клітинах досліджуваних штамів мікроорганізмів

Штами	Час культивування, доба											
	2				3				4			
	ГО	ГалО	MAO	ПО	ГО	ГалО	MAO	ПО	ГО	ГалО	MAO	ПО
<i>B. aclada</i>	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>B. allii</i>	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>M. fructicola</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. salmonicolor</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Totula sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. chartarum</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. pini</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. pullulans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>T. roseum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. glaucus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>T. lignorum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. oryzae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примітка: «+» – спостерігали появу забарвлення, «-» – не спостерігали появи забарвлення.

Як видно з табл. 1, найкращими продуцентами внутрішньоклітинних оксидаз (ВКО) серед досліджуваних представників є штами мікроскопічних грибів *B. allii* та *B. aclada*. Активність ферментів проявляється на третю й четверту доби культивування. Серед досліджуваних штамів низьку активність ПО проявляв *S. salmonicolor*. Штам *S. chartarum* проявляє активність на всі оксидази, але у ході подальших експериментів було показано, що цей штам є продуцентом лакази. Отже, для докладного вивчення активності ВКО було відібрано штами *B. allii* та *B. aclada*.

При вивченні позаклітинних оксидаз (ПКО) було виявлено, що штами *S. salmonicolor* та *S. chartarum* характеризувалися активністю всіх оксидаз (давали неспецифічну реакцію з *o*-діанізидином і АБТС за браком субстратів відповідних оксидаз), але у ході подальших експериментів ми встановили, що ці штами є продуцентами позаклітинної лактази, яка може неспецифічно взаємодіяти з АБТС. Інші досліджувані штами не виявляли активності ПКО.

Оптимізація умов культивування штамів-продуцентів ГО та ГалО

Дослідження впливу джерел Карбону в середовищі культивування на активність оксидаз є важливим етапом оптимізації умов для максимальної продукції відповідного ферменту. Визначали активність ГалО і ГО у клітинах обраних штамів грибів *B. allii* та *B. aclada*, що росли 3 доби у середовищах різного складу: як джерело Карбону використовували глюкозу або гліцерол (рис. 1). Як видно з представлених результатів, активність ГалО у клітинах *B. aclada*, культивованих на обох середовищах, є вищою (рис. 1, А). Активність ГО у клітинах *B. allii*, культивованих на середовищі з гліцеролом, є вищою, порівняно з *B. aclada*. Активність ГО у клітинах *B. allii*, культивованих на середовищі з глюкозою, є низькою, а у клітинах *B. aclada* її практично немає (рис. 1, Б).

Докладні дослідження із вивчення оптимальних умов культивування продуцентів для забезпечення максимального накопичення ВКО здійснювали на прикладі ГО. Вплив джерел Карбону в середовищі культивування на активність ГО вивчали шляхом визначення активності ферменту в розчині ОП-методом окиснення *o*-діанізидину (рис. 2, А) та візуалізацією зон активності ГО після електрофоретичного розділення білків БЕ (рис. 2, Б). Як видно з рис. 2, А, активність ГО у БЕ є найвищою за культивування клітин на середовищі із гліцеролом. Отримані результати визначення активності ГО добре корелюють із даними, наведеними на електрофореграмі (рис. 2, Б).

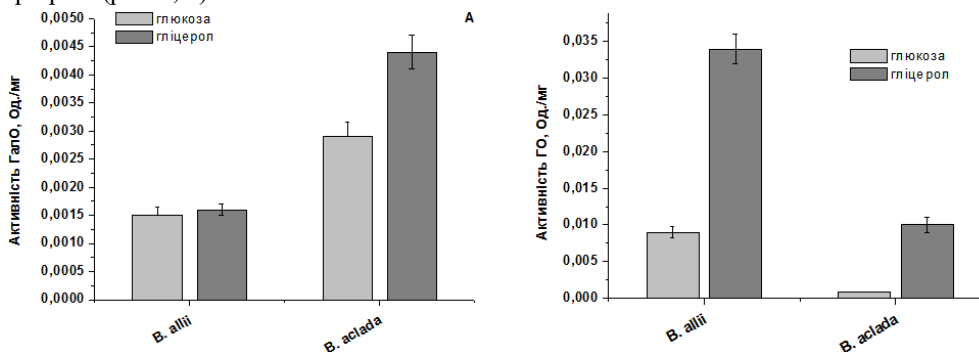


Рис. 1. Активність ГалО (А) та ГО (Б) на третю добу культивування, визначена у безклітинних екстрактах *B. allii* та *B. aclada* ОП-методом

З метою визначення оптимального часу росту продуцентів їх культивували протягом 5 діб у середовищі, що містило гліцерол як джерело Карбону, щодоби вимірювали активність ГО (рис. 3). Найвища активність ГО у *B. allii* проявляється на другу добу культивування, у *B. aclada* – на четверту добу.

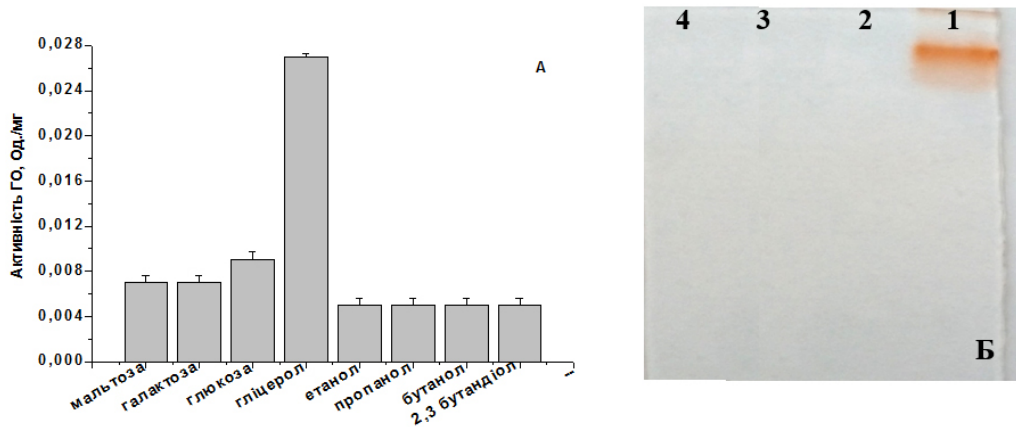


Рис. 2. Вплив джерел Карбону у середовищі культивування на активність ГО у БЕ грибів *B. allii*: А – активність, визначена спектрофотометрично; Б – візуалізація зон активності ферменту в нативному 10 % ПААГ. Джерела Карбону в середовищі: 1 – гліцерол, 2 – глюкоза, 3 – мальтоза, 4 – галактоза

Отже, у подальших експериментах для отримання препаративних кількостей продуцента ГО спори гриба *B. allii* висівали у мінеральне середовище з рН 5,5, що містило гліцерол як єдине джерело Карбону та культивували упродовж 48 годин.

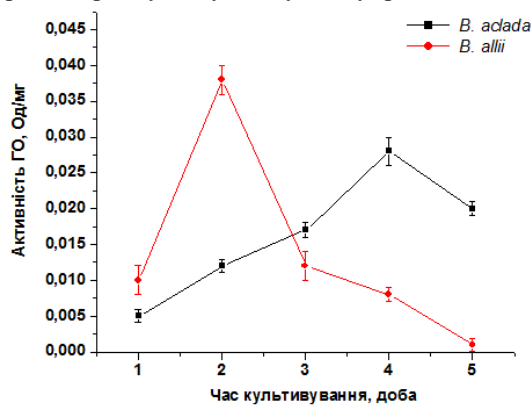


Рис. 3. Залежність активності ГО від часу культивування у штамів *B. allii* та *B. aclada*

Виділення ГО із клітин *B. allii*

ГО у високоочищеному стані виділена з деяких представників аскоміцетів, актиноміцетів і дейтеромицетів. Найкращим субстратом для ГО є гліцерол, його значення K_M становить 10,4 мМ [19]. ГО *A. japonicus* активується іонами двовалентних металів Zn^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} і Co^{2+} . Найбільш ефективним є Zn^{2+} у концентрації 10 мМ. Інгібіторами ферменту є азид, ціанід калію, гідроксиламін [1, 4, 19].

З метою отримання стабільного очищеного препарату ГО модифікували схему виділення з БЕ та очищення ензиму, розроблену в попередніх дослідженнях [1, 7]. Для пошуку оптимального сорбенту отриманий БЕ наносили на скляні колонки (1,0 x 5,0 см), заповнені сорбентами: «Діасорб-аргінін» та «Діасорб-лізин», гепарин-силохром (СП «БіохіММак», Росія), CM-Sephadex C-25, DEAE-Toyopearl 650M (TSK-GEL, Японія), попередньо зрівноважені та промиті 50 мМ фосфатним буфером, рН 7,0 (ФБ). Збирали проскок (П) і „про-

мивні води” (ПВ), контролюючи в них активність ГО. Фермент елюювали зростаючими концентраціями NaCl від 0,1 до 1 М у ФБ.

Як видно з результатів, представлених на рис. 4, ГО не зв’язується із досліджуваними сорбентами, але при цьому препарат частково очищується, тому отримані П і ПВ можуть бути використані для наступного етапу очищення за використання інших сорбентів. Найкращі результати з очищення ГО отримали за використання сорбенту DEAE-Toypearl 650M (табл. 2).

Для очищеного препарату ГО досліджували вплив деяких іонів металів і можливих інгібіторів: фермент інкубували 30 хв в 0,1 М NaCl/ФБ зі солями деяких металів, доданих до концентрацій 1 та 20 мМ. Аналізували активність ГО візуально за допомогою АБТС. Іони Mn^{2+} , Mg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} підвищували активність ГО.

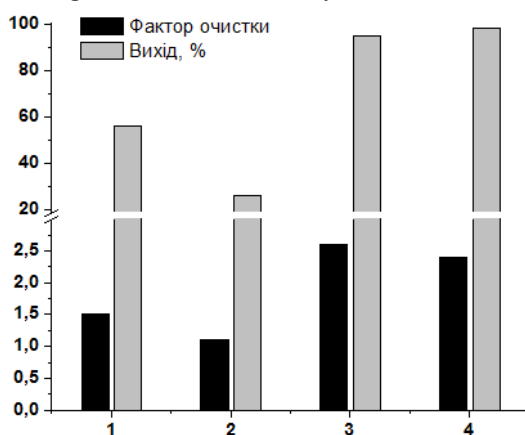


Рис. 4. Характеристика сорбентів, які було використано при очищенні ГО з безклітинного екстракту *V. allii*: 1 – «Діасорб-аргінін», 2 – «Діасорб-лізин», 3 – гепарин-силохром, 4 – CM-Sephadex C-25

Таблиця 2

Хроматографічне очищення ГО на сорбенті DEAE-Toypearl 650M

Зразок	Активність, Од./мл	Активність, Од./мг	Загальна активність	Вихід, %	Фактор очистки
БЕ	0,03	0,025	0,450	100	1
П+ПВ	0	0	0	0	0
Елюат 1 0,5 М NaCl/ФБ	0,018	0,080	0,063	14	3,2
Елюат 2 0,5 М NaCl/ФБ	0,168	0,414	0,292	65	16,6
Елюат 3 1М NaCl/ФБ	0,067	0,230	0,094	21	9,2

Для подальшого вдосконалення схеми виділення ГО можна використати додатковий етап очищення БЕ на сорбентах гепарин-силохром або CM-Sephadex перед основним сорбентом – DEAE-Toypearl 650M.

Конструювання клітинного сенсора на гліцерол

Стандартні методи визначення гліцеролу, такі як рідинна хроматографія та спектрофотометричні підходи на основі хімічних реакцій, є неселективними, а ферментативні підходи є надто дорогими для широкого застосування, прикладом чого

слугують мультиферментні системи [4]. У попередніх дослідженнях нами запропоновано амперометричні біосенсиори на гліцерол за використання препарату ГО [7, 17].

Для створення чутливого до гліцеролу мікробного сенсора другого покоління нами було використано біензимну схему, що включала пермеабілізовані клітини грибів із високою активністю ГО та комерційний препарат ПО (рис. 5). Для покращення переносу електронів від ПО було використано електроосаджений медіатор.

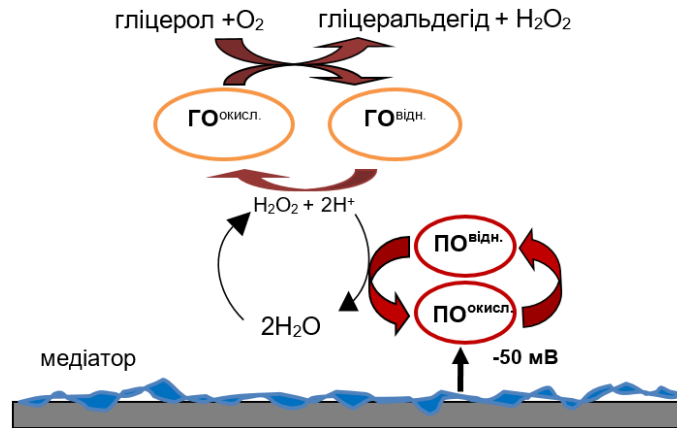


Рис. 5. Схема електронного переносу при двоензимній архітектурі біоселективного шару сенсора

Як видно із рис. 6, за внесення зростаючих концентрацій гліцеролу як субстрату при -50 мВ спостерігається зниження піку окислення, що підтверджує перебіг біензимної реакції окислення гліцеролу на поверхні біоелектрода. Отримані результати дають можливість побудувати калібрувальну криву для біоелектрода.

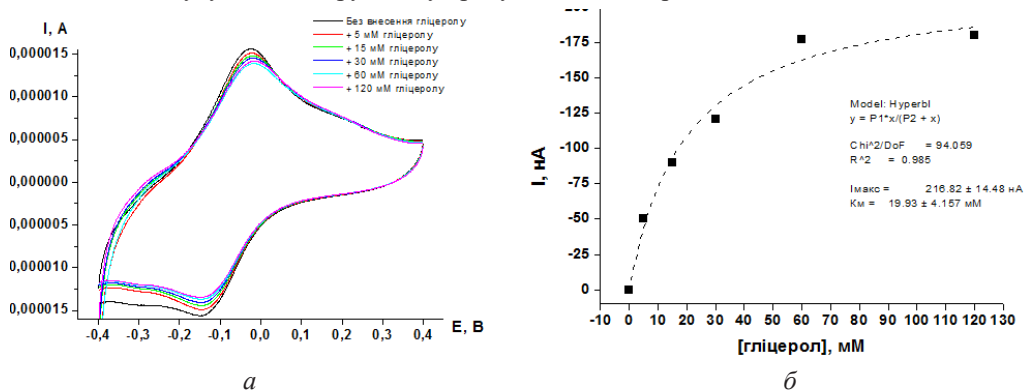


Рис. 6. Циклічна вольтамограма біоелектрода (а) та концентраційна залежність відгуку мікробного біосенсора при поступовому внесенні гліцеролу (б)

Сконструйований мікробний біосенсор демонструє відгук на гліцерол на рівні $216,82 \pm 14,48$ нА, а константа Міхаеліса-Ментен (Км) становить $19,93 \pm 4,157$ мМ. Протягом тижня відгук упав на 10 % від початкового сигналу, за 2 тижні – до нуля.

Таким чином, встановлено можливість розробки нового мікробного біосенсора на основі мікробних ПК із високим вмістом ГО та комерційної ПО. Запропонована оригінальна схема формування клітинно-ферментного біоселективного шару амперометричного сенсора демонструє високий відгук на аналіт і робить можливим її використання при створенні лабораторного прототипу гліцерол-селективного біосенсора.

Підсумовуючи отримані результати, можна відмітити, що нами було проведено скринінг штамів мікроорганізмів – продуцентів оксидаз і відібрано штами грибів *V. allii* та *V. aclada*, які характеризуються підвищеною активністю ГалО і ГО. Вивчено вплив різних джерел Карбону на активність цільових ферментів, з'ясовано, що найвища активність ГалО і ГО проявляється у грибів *V. aclada* та *V. allii*, які було культивовано на середовищі, що містить гліцерол. Найвища активність ГО у гриба *V. allii* спостерігається на другу добу культивування. Оптимізовано умови хроматографічного очищення ГО із клітин продуцента. Уперше сконструйовано лабораторний прототип амперометричного клітинного біосенсора на гліцерол за використання пермеабілізованих клітин штаму *V. allii*. Розроблений клітинно-ензимний біосенсор може бути перспективним для аналізу гліцеролу в реальних зразках.

Подяка. Роботу виконано за фінансової підтримки НАН України в рамках комплексної науково-технічної програми “Сенсорні прилади для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб: метрологічне забезпечення та дослідна експлуатація” (Проект 5/3-2016).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гайда Г. З., Павлішко Г. М., Смуток О. В. та ін. Гліцеролоксидаза плісеневого гриба *Botrytis allii*: виділення, характеристика та біоаналітичне використання // Дослідження в галузі сенсорних систем та технологій / за ред. акад. Г. В. Єльської, акад. В. Д. Походенко – К.: Ін-т мол. біології і генетики НАН України, 2006. С. 5-12.
2. Гончар М. В. Чутливий метод кількісного визначення пероксиду водню та субстратів оксидаз у біологічних об'єктах // Укр. біохім. журн. 1998. Т. 70. № 5. С. 157-163.
3. Остапович Б., Семенюк Ю., Ковалишин Я. та ін. Дослідження сенсорних властивостей метиламінооксидазного сенсора // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. хім. 2011. Т. 52. С. 382–391.
4. Павлішко Г. М., Гайда Г. З., Гончар М. В. Скринінг штамів продуцентів, очищення та первинна характеристика гліцеролоксидази із цвільових грибів // Вісн. Львів. у-ту, Сер. біол. 2004. Вип. 38. С. 67-73.
5. Azevedo A. M., Martins V. C., Prazeres D. M. F. et. al. Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology // Biotechnol. Ann. Rev. 2003. Vol. 9. P. 199–247.
6. Gonchar M., Zakalska O., Zakalskiy A. et. al. Impedance response to toxic methylamine of recombinant primary amine oxidase coupled with mercaptohexadecanoic acid monolayer // In the Book «Living Organisms and Bioanalytical Approaches for Detoxification and Monitoring of Toxic Compounds» / Eds: A. Sibirny et. al. 2015. Rzeszow University. P. 125-136. ISBN 978-83-7667-203-8.
7. Goriushkina T. B., Shkotova L. V., Gayda G. Z. et. al. Amperometric biosensor based on glycerol oxidase for glycerol determination // Sensor and Actuators B. 2010. Vol. 144. P. 361-367.
8. Haywood G. W., Large P. J. Microbial oxidation of amines. Distribution, purification and properties of two primary-amine oxidases from the yeast *Candida boidinii* grown on amines as sole nitrogen source // J. Biochem. 1981. Vol.199. №.1. P.187–201.
9. Hydrogen Peroxide for Industrial Applications // <http://www.h2o2.com/industrial/applications.aspx?pid=83>
10. Lin S. F., Chiou C. M., Tsai Y. C. Purification and characterization of a glycerol oxidase from *Penicillium sp.* TS – 622 // J. Enzyme Microb. Technol. 1996. Vol. 18. P. 383-387.
11. Lizcano J. M., Unzeta M., Tipton K. F. A spectrophotometric method for determining the oxidative deamination of methylamine by the amine oxidases // Anal. Biochem. 2000. Vol. 286, No.1. P. 75–79.

12. *Majkić-Singh N., Bogavac L., Kalimanovska V. et. al.* Spectrophotometric assay of xanthine oxidase with 2,2'-azino-di(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) (ABTS) as chromogen // *Clinica Chimica Acta*. 1987. Vol. 162. № 1 (15). P. 29-36.
13. Methylamines // https://www.chemours.com/Methylamines/en_US/uses_apps/index.html
14. *Parikka K., Master E., Tenkanen M.* Oxidation with galactose oxidase: Multifunctional enzymatic catalysis // *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic*. 2015. Vol. 120. P. 47–59.
15. *Paukner R., Staudigl P., Choosri W. et. al.* Expression, purification, and characterization of galactose oxidase of *Fusarium sambucinum* in *E. coli* // *Protein Expression and Purification*. 2015. Vol. 108. P. 73–79.
16. *Rajendran V., Irudayaraj J.* Detection of glucose, galactose, and lactose in milk with a microdialysis-coupled flow injection amperometric sensor // *J. Dairy Sci.* 2002. Vol. 85. № 6. P. 1357–1361.
17. *Smutok O., Gayda G., Dmytruk K. et. al.* Amperometric Biosensors for Lactate, Alcohols, and Glycerol Assays in Clinical Diagnostics / Chapter 20 in the Book “Biosensors – Emerging Materials and Applications” / Ed. P. A. Serra. ISBN 978-953-307-328-6. INTECH. 2011. P. 401-446.
18. *Stasyuk N. Ye., Smutok O. V., Zakalskiy A. A. et. al.* Methylamine-sensitive amperometric biosensor based on (His)₆-tagged *Hansenula polymorpha* methylamine oxidase immobilized on the gold nanoparticles // *BioMed. Research Intern.* Vol. 2014. Article ID 480498. – P. 1-8.
19. *Uwajima T., Akita H., Ito K. et. al.* Formation and purification of a new enzyme, glycerol oxidase and stoichiometry of the enzyme reaction // *J. Agric. Biol. Chem.* 1980. Vol. 44. P. 399-406.
20. *Uwajima T., Shimizu Y., Terada O.* Glycerol oxidase, a novel copper hemoprotein from *Aspergillus japonicus*. Molecular and catalytic properties of the enzyme and its application to the analysis of serum triglycerides // *J. Biol. Chem.* 1984. Vol. 259. P. 2748-2753.

Стаття: надійшла до редакції 30.06.16

доопрацьована 2.09.16

прийнята до друку 5.09.16

ОКСИДАЗЫ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ: СКРИНИНГ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ И ПЕРСПЕКТИВЫ БИОАНАЛИТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

О. Демків¹, С. Банах², Г. Клепач³, Г. Гайда¹, О. Смуток¹, М. Гончар¹

¹Інститут біології клітки НАН України

ул. Драгоманова, 14/16, Львов 79005, Україна

²Львовський національний університет імені Івана Франко

ул. Грушевського, 4, Львов 79005, Україна

³Дрогобычський державний педагогічний університет

імені Івана Франко

ул. Шевченко, 23, Дрогобыч 82100, Україна

e-mail: galina.gayda@gmail.com

Проведен скрининг ряду штаммов мікроскопічних грибів на здатність к синтезу практично важливих оксидаз (галактозооксидази, глицеролоксидази,

метиламиноксидазы и пероксидазы). Отобраны эффективные штаммы рода *Botrytis* как потенциальные продуценты глицеролоксидазы (ГО) и галактозооксидазы (ГалО). Исследовано влияние различных источников углерода и других условий культивирования на эффективность внеклеточного и внутриклеточного накопления ГО и ГалО. Разработана оптимальная схема выделения и очистки ГО из клеток *B. allii*, включающая колоночную хроматографию бесклеточного экстракта на ионообменном сорбенте DEAE-Toyoppearl650M. Получен препарат ГО с активностью 0,4 ед. / мг белка (фактор очистки 16,6, выход 65 %). Продемонстрирована возможность конструирования амперометрического микробного биосенсора на глицерол с использованием пермеабилizованных клеток *B. allii* как биоселективного элемента. Максимальный отклик биосенсора на глицерол 217 нА, константа Михаэлиса-Ментен 20 мМ. Выделенный фермент и клеточный сенсор могут быть перспективными для анализа глицерола в реальных образцах.

Ключевые слова: оксидазы микроскопических грибов, скрининг продуцентов, *Botrytis allii*, глицеролоксидаза, анализ глицерола.

FUNGAL OXIDASES: SCREENING OF STRAINS AND PERSPECTIVES OF BIOANALYTICAL APPLICATION

O. Demkiv¹, S. Banah², H. Klepach³, G. Gayda¹, O. Smutok¹, M. Gonchar¹

¹*Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine
14/16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine*

²*Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine*

³*Drohobych Ivan Franko State Pedagogical University
23, Shevchenko St., Drohobych, Lviv Region 82100, Ukraine*

The screening of a number of fungal strains on ability to synthesize practically important oxidases (galactose oxidase, glycerol oxidase, methylamin oxidase and peroxidase) was carried out. The effective strains of the *Botrytis* genus were selected as potential producers of glycerol oxidase (GO) and galactose oxidase (GalO). The influence of different carbon sources and other cultivation conditions on the effectiveness of extracellular and intracellular accumulation of GO and GalO was studied. The optimal scheme of GO isolation and purification from *B. allii* cells, using column chromatography of cell-free extract on ion exchange sorbent DEAE-Toyoppearl650M, was proposed. Enzyme preparation with activity 0.414 units/mg of protein (purification factor 16.6, yield 65%) was obtained. The possibility of construction of microbial amperometric biosensor for glycerol assay using permeabilized cells *B. allii* as bioselective element was demonstrated. Response of the biosensor on glycerol is about 217 nA and Michaelis-Menten constant is 20 mM. The isolated enzyme and the proposed biosensor may be promising for the analysis of glycerol in real samples.

Keywords: fungal oxidases, screening of producers, *Botrytis allii*, glycerol oxidases, glycerol analysis.