

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

**Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю _____
Кафедра _____ біотехнології і мікробіології _____**

«До захисту в ЕК»

Директор інституту(декан факультету)

(підпис) Наталія ГРЕРІГЧАК
(прізвище та ініціали)

« 08 » _____ грудня _____ 2025р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

(підпис) Віктор СТАБНІКОВ
(прізвище та ініціали)

« 08 » _____ грудня _____ 2025р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

зі спеціальності _____ 162 «Біотехнології та біоінженерія» _____
(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми _____ Промислова та фармацевтична
біотехнологія

на тему: _____ «Ліпоксигенази мікробного походження» _____

Виконала: здобувачка II курсу, групи ПФБ 2-1М

ПІХАЛО Владислава Олександрівна _____
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник _____ КРАСІНЬКО Вікторія Олегівна _____
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент _____
(прізвище та ініціали) (підпис)
Євген КУДРЯВЕЦЬ _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

Я як здобувач(ка) Національного університету харчових технологій розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавав(-ла) і не одержував(-ла) недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувачка _____
(підпис)

Київ – 2025 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ
Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології
Освітній ступінь магістр
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Промислова та фармацевтична біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології
Віктор СТАБНІКОВ

“ 01 ” жовтня 2025 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧКИ

ПІХАЛО Владислави Олександрівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Ліпоксигенази мікробного походження»
керівник роботи КРАСІНЬКО Вікторія Олегівна к.т.н. доцент,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від від 05.11.2025 року № 912-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 27.11.2025

3. Вихідні дані до роботи Літературні та експериментальні дані щодо класифікації, фізіолого-біохімічної ролі, структурно-функціональних особливостей, методів гетерологічної експресії, оптимізації синтезу, виділення, очищення та біохімічної характеристики рекомбінантних ліпоксигеназ у різних мікроорганізмах також їхнього використання як компонентів тест-систем для оцінки лікарських засобів.

4. Зміст пояснювальної записки РОЗДІЛ 1. Особливості одержання та перспективи практичного застосування ліпоксигеназ. Клонування та експресія рекомбінантних штамів-продуцентів ліпоксигенази; РОЗДІЛ 2. Біотехнологічні особливості синтезу та після-ферментаційного виділення і очищення ліпоксигеназ; РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування; РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору стадій технологічного процесу; РОЗДІЛ 5. Опис технологічної схеми; РОЗДІЛ 6. Контроль виробництва; РОЗДІЛ 7. Проект заявки на корисну модель

5. Перелік графічного матеріалу Апаратурна та технологічна схеми

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	Завдання прийняв

7. Дата видачі завдання 01 жовтня 2025 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
	Написання Розділу 1. Особливості одержання та перспективи практичного застосування ліпоксигеназ. Клонування та експресія рекомбінантних штамів-продуцентів ліпоксигенази, Розділу 2. Біотехнологічні особливості синтезу та післяферментаційного виділення і очищення ліпоксигеназ	01.10.2025- 23.10.2025	
	Написання Розділу 3. Техніко-економічне обґрунтування	23.10.2025- 30.10.2025	
	Написання Розділу 4. Обґрунтування вибору стадій технологічного процесу, Розділу 5. Опис технологічної схеми. АС та ТС схеми.	30.10.2025- 10.11.2025	
	Написання Розділу 6. Контроль виробництва	10.11.2025- 13.11.2025	
	Написання Розділу 7. Проект заявки на корисну модель	13.11.2025- 16.11.2025	
	Написання Реферату, Вступу та Висновків.	16.11.2025- 19.11.2025	
	Остаточне оформлення Кваліфікаційної роботи.	19.11.2025- 26.11.2025	

Здобувачка _____
(підпис)

Владислава ПІХАЛО
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Вікторія КРАСІНЬКО
(ім'я та прізвище)

ABSTRACT

The qualification work is devoted to the development of a biotechnological approach for obtaining recombinant lipoxygenases — enzymes that catalyze the formation of biologically active oxylipins and play a key role in the regulation of inflammatory, immune, and metabolic processes. The study systematizes modern literature data on the classification of lipoxygenases, their physiological and biochemical functions, structural and functional properties, as well as their potential applications in various fields, particularly in clinical research for inhibitor screening.

An overview of current methods for the heterologous expression of lipoxygenases in *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, *Bacillus subtilis* and other host organisms is presented. Approaches to optimizing expression are analyzed, including the selection of signal peptides, chaperones, autolysis systems, and mechanisms regulating enzyme folding. Optimal cultivation and induction conditions have been determined to obtain active enzymes with a high level of solubility.

Special attention is given to the methods of purification and isolation of recombinant lipoxygenases, including affinity chromatography and concentration steps. Approaches to the biochemical and kinetic characterization of the enzymes

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню біотехнологічного підходу до отримання рекомбінантних ліпоксигеназ — ферментів, що каталізують утворення біологічно активних оксіліпінів та відіграють ключову роль у регуляції запальних, імунних і метаболічних процесів. У роботі систематизовано сучасні літературні дані щодо класифікації ліпоксигеназ, їх фізіолого-біохімічної ролі, структурно-функціональних особливостей, а також перспектив застосування у різних галузях, зокрема в клінічних дослідженнях для скринінгу інгібіторів.

Подано огляд сучасних методів гетерологічної експресії ліпоксигеназ у *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, *Bacillus subtilis* та інших продуцентів. Проаналізовано підходи до оптимізації експресії, включаючи підбір сигнальних пептидів, шаперонів, систем автолізу та регуляції складання ферментів. Визначено оптимальні умови культивування та індукції синтезу для отримання активних ферментів із високим рівнем розчинності.

Особливу увагу приділено методам виділення й очищення рекомбінантних ліпоксигеназ, включаючи афінну хроматографію та стадії концентрування. Розглянуто підходи до біохімічної та кінетичної характеристик ферментів, визначення їхньої субстратної специфічності, активності та стабільності.

Робота складається зі вступу, семи розділів, висновків і списку літератури. Загальний обсяг – 106 сторінок, містить 14 таблиць і 2 рисунків. Графічна частина включає технологічну схему отримання та очищення рекомбінантної ліпоксигенази (формат А3).

Ключові слова: ліпоксигеназа, рекомбінантні ферменти, гетерологічна експресія, клінічні дослідження, білкова інженерія, біотехнологія.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

LOX – ліпоксигеназа

ПНЖК – поліненасичені жирні кислоти

LA – лінолева кислота

ALA - α -ліноленової кислоти

IPTG -ізопропіл- β -D-тіогалактозид

АФІ – активні фармацевтичні інгредієнти

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

ЗМІСТ

АВСТАСТ.....	4
РЕФЕРАТ.....	5
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	6
ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ 1. Особливості одержання та перспективи практичного застосування ліпоксигеназ. Клонування та експресія рекомбінантних штамів-продуцентів ліпоксигенази.....	11
1.1 Особливості структури та субстратна специфічність ліпоксигеназного комплексу ферментів.....	11
1.2 Практичне застосування ліпоксигеназ.....	17
1.3 Мікробний синтез ліпоксигеназ.....	19
1.4 Переваги рекомбінантних ліпоксигеназ.....	25
1.5 Особливості створення рекомбінантних штамів продуцентів ліпоксигеназ.....	41
РОЗДІЛ 2. Біотехнологічні особливості синтезу та післяферментаційного виділення і очищення ліпоксигеназ.....	42
2.1. Вибір субстрату для синтезу ліпоксигеназ.....	42
2.2. Виділення і очищення ліпоксигеназ після ферментації.....	43
2.3. Методики визначення активності ліпоксигеназ.....	50
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	57
3.1. Характеристика цільового продукту.....	57
3.2 Потреба у цільовому продукті.....	59
3.3 Розрахунок річної потреби.....	60
3.4. Розрахунок потужності виробництва ліпоксигенази.....	62
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору стадій технологічного процесу.....	64
4.1. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання ліпоксигенази.....	64
4.1.1. Етапи виділення й очищення ЛОГ.....	68
4.1.2. Відокремлення біомаси.....	68
4.1.3. Лізис клітин.....	71

4.1.4. Нікель-афінна (біо-специфічна) хроматографія.....	71
4.1.5.Сублімація.....	73
4.2. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях.....	75
4.3. Специфікація обладнання.....	82
РОЗДІЛ 5. Опис технологічної схеми.....	84
РОЗДІЛ 6. Контроль виробництва.....	88
6.1. Карта постадійного контролю.....	88
6.2. Визначення активності ліпоксигенази.....	89
6.3. Визначення чистоти ліпоксигенази.....	90
6.4. Визначення залишкової вологості методом Карла Фішера.....	92
РОЗДІЛ 7. Проєкт заявки на корисну модель.....	95
ВИСНОВКИ.....	102
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	103

ВСТУП

Запалення – це складний і добре регульований процес, критично важливий для життя та підтримки гомеостазу організму та тканин. Однак запальні реакції, коли вони надмірні або невирішені, також можуть призвести до шкідливих наслідків. Медіатори запалення здатні викликати ознаки запалення, такі як залучення та накопичення імунних клітин і втрата плазми з дрібних судин в інтерстиціальний простір у запаленій тканині. [1] Головним завданням імунної системи є захист організму від вторгнення патогенів. Це складна мережа регуляторів, яка контролює баланс між захистом і толерантністю (Ferdinando Bruno, Giuseppe Spaziano та ін., 2017)

Пригнічення запалення є важливим напрямом коригуючої фармакотерапії захворювань різної етіології. Сьогодні фармацевтична промисловість виробляє протизапальні лікарські засоби різної хімічної структури та направленості дії. Однак всі вони мають побічні ефекти, від низької біодоступності до невисокої ефективності та руйнівної дії на слизові оболонки кишково-шлункового тракту. Тому дослідження нових активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) та плейотропних фармакологічних властивостей відомих АФІ з потенційною протизапальною дією є актуальним. Однією з таких речовин є діосмін – флавоноїд, який належить до поліфенольних сполук флавонової структури. Лікарські засоби цієї групи, що містять діосмін, застосовують для лікування симптомів венозно-лімфатичної недостатності (В. І. Бессарабов, Н. П. Здерко, 2023).

					НУХТ БТЕК 02.01.19 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Піхало В. О.			Вступ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Красінько В.О.					9	1
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Молекулярний механізм дії діосміну не встановлено. Однак у клінічному дослідженні показано, що середній рівень у сироватці крові таких медіаторів за-палення, як TNF-альфа, VEGF-C, VEGF-A, IL-6, був знижений після терапії пацієнтів лікарським засобом на основі діосміну (В. І. Бессарабов, Н. П. Здерко, 2023).

Загальні тенденції європейської дослідницької практики пов'язані з максимальним із можливо прийнятним переведенням досліджень фармакологічних властивостей АФІ з *in vivo* на *in vitro* (чи *ex vivo*). Тому доцільним є розробка методів дослідження протиза-пальних властивостей речовин без використання тварин. Одним із таких методів дослідження протизапальних властивостей є вивчення інгібування ензиму 15-ліпоксигенази. Інгібуючі ефекти 15-ліпоксигенази переважно оцінюють за допомогою 15-ліпоксигенази сої (15-sLOX) або 15-ліпоксигенази з ретикулоцитів кролика для аналізу *in vitro*. 15-sLOX зазвичай застосовували як модель людської 15-ліпоксигенази через подібність у структурі та механізмі взаємодії. Використання методів *in vitro* дослідження властивостей потенційних АФІ є актуальним та віддає переваги у пришвидшенні фармакологічної та фармацевтичної розробки нових протизапальних лікарських засобів (В. І. Бессарабов, Н. П. Здерко, 2023).

Велика кількість доказів довела активність та роль LOX у запаленні, сенсibiliзації та багатьох видах раку. Таким чином, вивчення цих ферментів, метаболізму їхніх перекисних продуктів, а також розробка або відкриття інгібіторів LOX є дуже важливим (Ala Orafaie, Mina Mousavian та ін., 2020).

РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ОДЕРЖАННЯ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПРАКТИЧНОГО ЗАСТОСУВАННЯ ЛІПОКСИГЕНАЗ. КЛОНУВАННЯ ТА ЕКСПРЕСІЯ РЕКОМБІНАНТИХ ШТАМІВ - ПРОДУЦЕНТІВ ЛІПОКСИГЕНАЗИ

1.1 Особливості структури та субстратна специфічність ліпоксигеназного комплексу ферментів

Ліпоксигенази (LOX) - це ферменти, які каталізують діоксигенацію поліненасичених жирних кислот у гідропероксиди жирних кислот. Утворені гідропероксиди жирних кислот представляють інтерес, оскільки вони можуть бути легко перетворені в ряд сполук із доданою вартістю. LOX широко поширені як в еукаріотичних, так і в прокаріотичних організмах, включаючи людей, тварин, рослини, гриби та бактерії. Порівняно з еукаріотичними ферментами, бактеріальні ферменти, як правило, легше виробляти в промислових масштабах у гетерологічному хазяїні (Ruth Chrisnasari et al., 2022).

Ліпоксигенази у багатьох джерелах інформації характеризують як негемові залізо- (або в деяких випадках марганець-) залежні ферменти, які каталізують регіоселективне діоксигенування 1 Z ,4 Z - пентадієнових фрагментів поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) з утворенням гідропероксижирних кислот. LOX з різних джерел відрізняються за перевагою субстрату та регіоселективністю. LOX ссавців зазвичай активні щодо арахідонової кислоти та лінолевої кислоти (LA), деякі також активні щодо α -ліноленової кислоти (ALA), ейкозапентаєнова кислота (EPA) і докозагексаєнової кислоти (DHA). Рослинні LOX здебільшого активні по відношенню до LA, ALA та/або γ -ліноленової кислоти (GLA).

					НУХТ БТЕК 02.01.19 КР ПЗ					
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. Особливості одержання та перспективи практичного застосування ліпоксигеназ. Клонування та експресія рекомбінантних штамів-продуцентів ліпоксигенази		Літ.	Арк.	Акрушів	
Розроб.		Піхало В. О.						11	1	
Перевір.		Красінько В.О.					Кафедра БТМ			
Консультант										
Н. Контр.										
Затверд.		Стабніков В.П.								

Подібно до рослинних LOX, грибні LOX здебільшого активні щодо LA та ALA. Повідомлялося, що бактеріальні LOX активні щодо широкого спектру поліненасичених жирних кислот (Ruth Chrisnasari et al., 2022).

Типовим продуктом LOX є окремий хіральний гідропероксид жирної кислоти. Примітно, що існує фермент LOX, специфічний для більшості доступних позицій на звичайних субстратах, лінолевій та арахідоновій кислотах. Відомо, що ферменти LOX окиснюють лінолеву кислоту в трьох з чотирьох доступних положень (9 R , 9 S або 13 S), 9 і існують ферменти LOX, специфічні для 10 з 12 доступних положень арахідонової кислоти (5 R , 5 S , 8 R , 8 S , 9 R , 11 R , 11 S , 12 R , 12 S і 15 S) відомі в природі 1 , 10 , 11 ці ферменти відкриті для клонування та експресії (Marcia E Newcomer et al., 2014).

Особливостями структури ліпоксигеназ є те, що еукаріотичні LOX складаються з одного поліпептидного ланцюга, який містить три домени: N-кінцевий поліцистину-1 ліпоксигенази, альфа-токсину (PLAT) β -ланцюг та C-кінцевого каталітичного домену (рис. 1.1). Повідомлялося, що N-кінцевий поліцистин-1 ліпоксигеназа домен функціонує як домен зв'язування мембрани для отримання субстрату безпосередньо з мембрани. Цей домен не є суттєвим для каталітичної активності, оскільки деякі N-кінцеві усічені LOX ссавців були каталітично активними. Однак усічені види ферментів продемонстрували погіршені властивості зв'язування з мембраною та змінену кінетику реакції, що свідчить про потенційну роль N-кінцевого поліцистин-1 ліпоксигеназного домену в регуляції каталітичного обміну. Каталітичний домен переважно α -спіральний і містить негемовий кофактор заліза в активному центрі. Негемове залізо октаедрично координується водним лігандом і консервативними амінокислотними залишками, якими є три гістидини, один аспарагін або четвертий гістидин, і карбоксилат C-кінцевого залишку, яким зазвичай є ізoleyцин (Ruth Chrisnasari et al., 2022).

На даний момент докладно досліджено лише дві кристалічні структури бактеріальних LOX. Кристалічна структура *P. aeruginosa* LOX представлена лише одним доменом (тобто С-кінцевим каталітичним доменом. У цьому ферменті N-кінцевий β -домен, знайдений в еукаріотичних LOX, замінюється подвійними антипаралельними α -спіралями, утвореними вставкою приблизно 100 амінокислотних залишків. Часткове або повне генетичне зрізання цих N-кінцевих α -спіралей робить фермент нерозчинним, що свідчить про те, що ці N-кінцеві α -спіралі необхідні для солюбілізації ферменту (Ruth Chrisnasari et al., 2022).

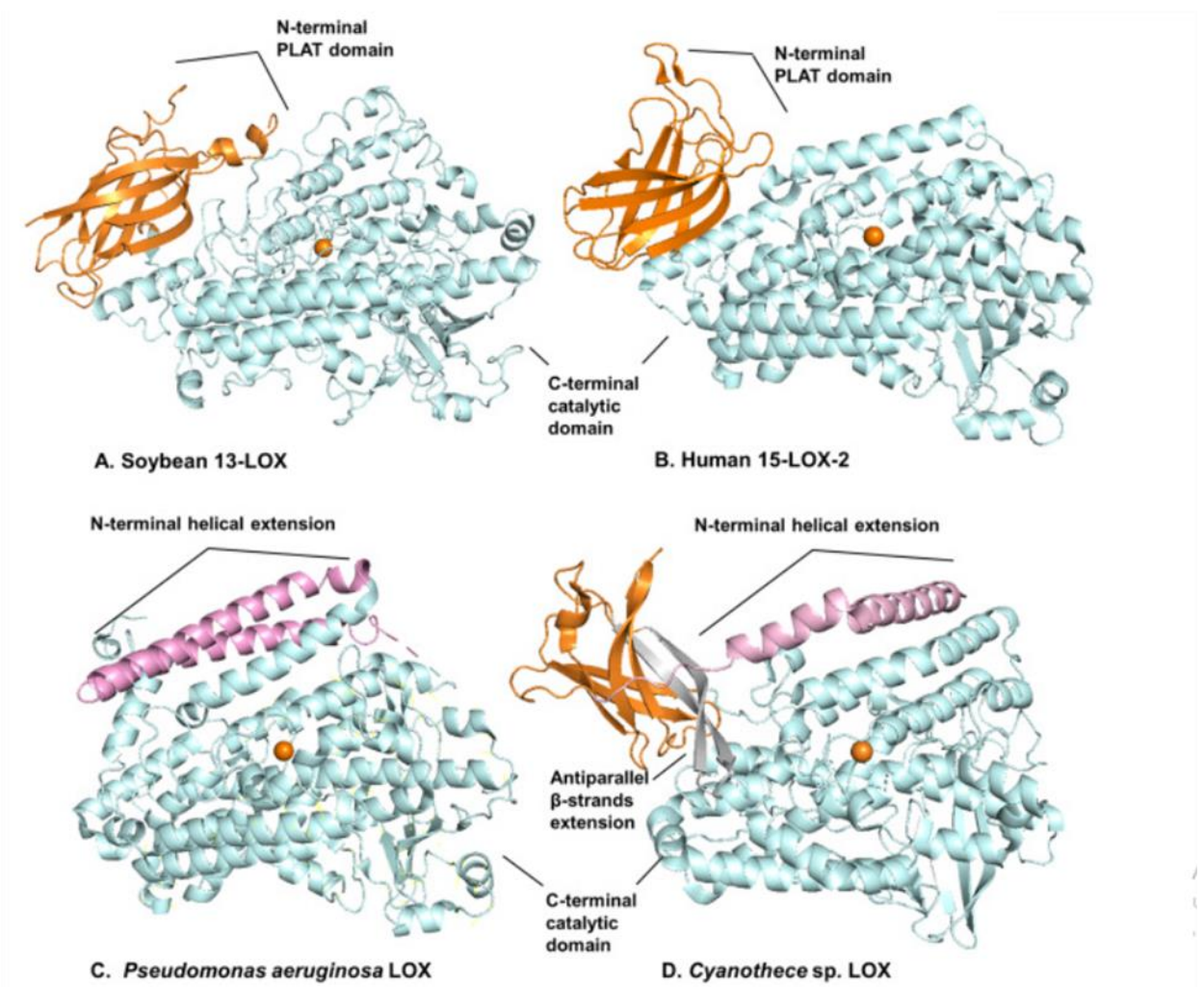


Рис 1.1 Кристалічна структура двох бактеріальних LOX порівняно з еукаріотичними LOX. (Ruth Chrisnasari et al., 2022).

Натомість для ціанобактерій *Cyanothecе sp.* встановлено, що ліпоксигеназа, яку дослідники позначили як PCC 8801 LOX має два домени та N-кінцеве спіральне розширення, що нагадує α -спіральну вставку в *P. aeruginosa*. LOX PCC 8801 *Cyanothecе sp.* також включає два антипаралельні β -ланцюги, які надзвичайно розширені, що призводить до зміни позиційного розташування β -домену відносно каталітичного домену порівняно з еукаріотичними LOX. На відміну від еукаріотичних LOX, N-кінцевий поліцистин-1 ліпоксигеназний домен не відіграє значної ролі в мембранному зв'язуванні, але важливий для каталітичної активності ферменту (Ruth Chrisnasari et al., 2022).

Порівняння структурних та функціональних особливостей ліпоксигеназ різного походження наведено у табл. 1.1.

Таблиця 1.1

Порівняльна характеристика ліпоксигеназ різного походження

Ліпогсигеназа (джерело)	Особливості структури	Субстратна специфічність	Джерело інформації
Соя (LOX-1)	Складається з N-кінцевого β -домену та спірального C-кінцевого домену	LOX-1 активний щодо лінолевої кислоти	Akikazu Hatanaka et al., 2014; Enrico Dainese et al., 2005
Ціанобактерії (LOX PCC 8801)	<i>Cyanothecе sp.</i> PCC 8801 LOX має два домени та N-кінцеве спіральне розширення, що нагадує α -спіральну вставку, <i>Cyanothecе sp.</i> PCC 8801 LOX також включає два антипаралельні β -ланцюги	LOX PCC 8801 активний щодо лінолевої кислоти	Ruth Chrisnasari et al., 2022; Julia Newie et al., 2016

Закінчення таблиці 1.1

Псевдомонади((Pa_LOX)	Pa_LOX - це мономери, що містять один домен, структурно пов'язаний з каталітичним доменом еукаріотичних LOX	Pa_LOX активний щодо арахідонової кислоти	Albert Garreta et al., 2013
Ссавці	LOX ссавців є білками з одним поліпептидним ланцюгом, які згортаються в структуру з двох доменів. Невеликий (приблизно 15 кДа) N-кінцевий домен складається з кількох паралельних і антипаралельних β -ланцюгів і бере участь у регуляції активності та зв'язуванні з мембраною. С-кінцевий каталітичний домен складається з кількох спіралей і містить каталітичне негемове залізо, локалізоване в передбачуваній кишні, що зв'язує субстрат	LOX ссавців активний щодо арахідонової кислоти	Hartmut Kuhn et al., 2014

Соя (LOX-1) Складається з N-кінцевого β -домену та спірального С-кінцевого домену LOX-1 активний щодо лінолевої кислоти (Akikazu Hatanaka et al., 2014; Enrico Dainese et al., 2005).

Ціанобактерії (LOX PCC 8801) *Cyanothece* sp. PCC 8801 LOX має два домени та N-кінцеве спіральне розширення, що нагадує α -спіральну

вставку, Cyanothecae sp. PCC 8801 LOX також включає два антипаралельні β -ланцюги LOX PCC 8801 активний щодо лінолевої кислоти (Ruth Chrisnasari et al., 2022; Julia Newie et al., 2016).

Псевдомонади(Pa_LOX) - це мономери, що містять один домен, структурно пов'язаний з каталітичним доменом еукаріотичних LOX Pa_LOX активний щодо арахідонової кислоти (Albert Garreta et al., 2013).

Ссавці LOX ссавців є білками з одним поліпептидним ланцюгом, які згортаються в структуру з двох доменів. Невеликий (приблизно 15 кДа) N-кінцевий домен складається з кількох паралельних і антипаралельних β -ланцюгів і бере участь у регуляції активності та зв'язуванні з мембраною. C-кінцевий каталітичний домен складається з кількох спіралей і містить каталітичне негемове залізо, локалізоване в передбачуваній кишені, що зв'язує субстрат LOX ссавців активний щодо арахідонової кислоти (Hartmut Kuhn et al., 2014).

Ферменти LOX ініціюють, контролюють і припиняють вільнорадикальну реакцію між жирною кислотою субстрату та молекулярним киснем. Негемове залізо ініціює реакцію за допомогою стереоселективної H-абстракції на одній стороні жирної кислоти, а потім кисень реагує на протилежній стороні, антарифаціальний зв'язок, загальний для всіх LOX-каталізів. Основа специфічності повинна включати (1) точне розташування жирної кислоти - вуглецевий ланцюг в активному центрі, (2) орієнтація жирної кислоти від голови до хвоста та (3) доступ молекулярного кисню до один або інший кінець пентадієну, що реагує (Marcia E Newcomer et al., 2014).

Пункт (1) передбачає «зсув рамки», оскільки жирна кислота може ковзати на різну глибину в активний центр і піддавати вибраний пентадієн реакції із залізом. Наприклад, різниця між 12- S і 15- S оксигенацією арахідонової кислоти включає цей зсув у реєстрі субстрату. Пункт (2), перемикає орієнтації жирної кислоти в активному центрі «голова-хвіст», вперше було

досліджено на початку 1970-х років після відкриття того, що рослинні 9S - LOX і 13S - LOX поглинають 11pro- R і 11pro- S водень відповідно з лінолевої кислоти. Пункт (3), доступ O₂ до одного або іншого кінця пентадієну, що реагує, є остаточним визначальним фактором специфічності R або S (Marcia E Newcomer et al., 2014).

1.2 Практичне застосування ліпоксигеназ

Ліпоксигенази (LOX), як біологічні каталізатори, мають комерційну цінність у різних галузях промисловості, включаючи, але не обмежуючись, застосуванням у харчовій промисловості, зокрема у виробництві хліба, де LOX використовують для відбілювання та покращення текстури, посилення аромату та смаку хлібо-булочних виробів (Gaofeng Liu et al., 2023).

У присутності кисню ліпоксигеназа окислює ненасичені жирні кислоти та утворює гідропероксиди ліпідів, які покращують структуру тіста шляхом окислення ненасичених жирних кислот і згодом вступають у реакцію зі специфічними хімічними компонентами борошна. Як наслідок, стабільність тіста та його підйом збільшуються, що разом може збільшити об'єм кінцевого продукту. Що стосується виробництва хліба, то ферменти ліпоксигенази мають перевагу перед сучасними хімічними добавками. У борошномельній та хлібопекарській промисловості вже давно використовуються хімічні відбілювачі, переважно пероксид бензоїлу (BPO). Через велику занепокоєність можливим негативним впливом BPO на здоров'я деякі країни Європи та Китай заборонили використання BPO у борошні. Іншою хімічною альтернативою є азодиформамід, але, зважаючи на можливі негативні ефекти, дозування цієї сполуки обмежене 40 ppm. При такій мінімальній дозі відбілюючий ефект досить низький. Таким чином, ферментні добавки, особливо LOX можуть замінити хімікати для переробки борошна, що призводить до відбілювання хліба та покращення його текстури. Крім того, гідропероксиди ліпідів знебарвлюють тісто і окислюють каротиноїди, перетворюючи їх на безбарвні сполуки. Це відбілювання тіста призводить до

більш світлого кольору продукту, що дуже бажано. Що стосується ензимів, які використовуються в харчовій промисловості, нормативні документи часто вимагають, щоб ферменти були визнані або доведені як безпечні для використання. У випадку ліпоксигеназ, враховуючи, що вони повсюдно зустрічаються в рослинах і споживаються як людьми, так і тваринами, рослинні ліпоксигенази вважаються безпечними для використання, а отже, мають велику цінність для хлібопекарної галузі (Gaofeng Liu et al., 2023).

Проте, незважаючи на те, що соєві екстракти, що містять високі рівні ліпоксигеназ, використовувалися як добавки для виробництва хліба, соя створює небажаний смак і запах і, відповідно, не часто є корисним варіантом. Через велике практичне значення рослинних LOX рекомбінантні рослинні ліпоксигенази із сої, рису, картоплі та інших джерел почали експресувати шляхом гетерологічної експресії в мікробні клітини (Gaofeng Liu et al., 2023).

Також невеликі кількості ліпоксигеназ мають відбілюючий ефект на молочні продукти, такі як молоко, сир, вершкове масло, вершки, сироваткові продукти. Молочні продукти — це продукти, які містять щонайменше 10 % мас., переважно щонайменше 30 % мас., більш переважно щонайменше 50 % мас., ще більш переважно щонайменше 70 % мас. /мас.% на сухі речовини компонентів молока, переважно коров'ячого. Компонентами молока є, наприклад, жири, білки тощо. Молоко, особливо коров'яче, може природним чином містити барвники, такі як β -каротин. Механізм відбілювання ліпоксигеназою заснований на окислювальному переході подвійних зв'язків у β -каротині (або інших каротиноїдах чи інших сполуках, що мають подвійні зв'язки) радикалами, що утворюються в реакції ліпоксигенази та н-лінолевої кислоти (Andre Leonardus de Roos et al., 2006).

Ферментативне відбілювання може не призводити до появи сторонніх присмаків, які можуть вплинути на смак обробленого молочного продукту. Відбілюючий ефект ліпоксигенази в молочних продуктах є особливим, оскільки фермент присутній у водній фазі, тоді як жирні кислоти присутні в

частинках жиру молочного продукту. Крім того, бета-каротин, який присутній в коров'ячому молоці, присутній в жировій фазі. Ліпоксигеназу додають до молока перед початком процесу виготовлення сиру або будь-якого іншого процесу перетворення або сепарації молока. Ліпоксигеназу також можна додавати на більш пізній стадії, наприклад, під час виготовлення сиру, одночасно з додаванням сичужного ферменту. Крім того, ліпоксигеназу можна додавати до сиру в кінці виробництва. Також ліпоксигеназу можна додавати до сироватки або до продуктів, отриманих із сироватки, таких як сироватковий білок або гідролізати сироватки (Andre Leonardus de Roos et al., 2006).

Концентрація LOX, необхідна для відбілювання молочного продукту загалом складає від 10 до 1000 одиниць активності ліпоксигенази на грам молочного продукту (переважно використовують дозування від 50 до 500 одиниць активності LOX на грам молочного продукту) для його відбілювання (Andre Leonardus de Roos et al., 2006)

Також LOX мають важливе значення і в інших галузях харчової промисловості, оскільки гідропероксиди жирних кислот, які вони утворюють, беруть участь у формуванні приємних ароматів, які називаються ароматами зеленого листя, бажаними під час певних харчових технологічних процесів. Наприклад, 2 E -гексанол має фруктовий смак і може використовуватися як підсилювач смаку для алкогольних напоїв, тоді як 3 Z -гексанол має сильний запах зеленої трави. Летючі речовини зеленого листя – це, як правило, альдегіди та спирти, що утворюються шляхом спільної дії LOX, гідропероксидліази та алкогольдегідрогенази. Летючі альдегіди з коротким ланцюгом, такі як гексаналь і 3Z - ноненал, можуть утворюватися шляхом каталізованого гідропероксидліазою розщеплення гідропероксидів жирних кислот. Гідропероксидліаза розщеплює гідропероксиди жирних кислот на 6- або 9-вуглецеві леткі альдегіди залежно від специфічності ферменту. Ці альдегіди можуть бути далі перетворені в спирти алкогольдегідрогеназою. Через свою специфічність бактеріальні LOX мають багатообіцяюче

застосування для виробництва цих смако-ароматичних сполук високої чистоти (Ruud Heshof et al., 2015).

1.3 Мікробний синтез ліпоксигеназ

Одержання ліпоксигеназ мікробного походження має ряд переваг перед використанням рослинних і тваринних джерел цього комплексу ферментів. По-перше, швидкий ріст і висока продуктивність: багато мікроорганізмів здатні швидко розмножуватися і виробляти велику кількість цільового продукту. По-друге, генетична модифікація: мікроорганізми легко піддаються генетичній інженерії, що дозволяє оптимізувати процес виробництва і створювати штами з поліпшеними характеристиками. Також контрольовані умови культивування: мікробний синтез можна здійснювати в біореакторах при строго контрольованих умовах, що забезпечує високу відновлюваність процесу. В даний час комерційні препарати LOX в основному одержують шляхом екстракції рослинних тканин або фруктів. Оскільки використовуються різні партії сировини, якість LOX нестабільна. Завдяки досягненням ферментної інженерії мікробне виробництво LOX все більше демонструє свої переваги, включаючи низьку вартість і високу чистоту. Зокрема, бактерії *E. coli* найбільш широко розглядаються як мікроорганізм-господар для виробництва гетерологічних білків, включаючи LOX. (Cuiping Pang et al., 2022).

LOX зустрічаються у природних штаммах бактерій, хоча їх не дуже багато. Досі LOX були виявлені у грамнегативних бактерій, таких як *Pseudomonas aeruginosa*, *Cyanothece sp.*, *Anabaena sp.* та *Mucococcus xanthus*. Єдиними грампозитивними бактеріями, про які на сьогодні відомо, що мають LOX, є *Streptomyces canosus* і *Streptomyces massasporeus*. (Ruth Chrisnasari et al., 2022).

Комерційні LOX наразі в основному отримують шляхом екстракції рослинних тканин. Однак промислове виробництво LOX стикається зі значними проблемами, пов'язаними з низькою швидкістю вилучення та

чистотою ферменту. Мікробна гетерологічна експресія була застосована для подолання цих обмежень, але вона все ще має недоліки, такі як низька каталітична ефективність і низька стабільність, що робить її непридатною для промислового застосування.

Спрямована еволюція є одним із найбільш популярних методів білкової інженерії для посилення каталітичної активності ферментів. Цей метод дозволяє вводити безліч випадкових мутацій виключно на основі інформації про послідовність амінокислот, пропонуючи широкий спектр можливостей для підвищення ефективності ферменту. Описані на даний момент ферменти LOX мають недоліки такі як низька каталітична ефективність, погана термічна стабільність і недостатня специфічність субстрату. Ці обмеження не відповідають вимогам промислового застосування. Спрямована еволюція є ефективним шляхом для покращення каталітичної активності ферментів. Цей метод передбачає навмисне створення умов, що віддзеркалюють природну еволюцію ферментів, з подальшим високопродуктивним скринінгом для виявлення мутантів з розширеними каталітичними можливостями. Численні ферменти зазнали посилення каталітичної активності за допомогою стратегій спрямованої еволюції. На сьогоднішній день існує лише один задокументований випадок спрямованої еволюції, застосованої до LOX. Гуо успішно отримав мутазу D22 *Anabaena* LOX шляхом спрямованої еволюції, що призвело до незначного підвищення термічної стабільності та каталітичної активності (Guo et al., 2014). До цього часу мутанти LOX як з високою каталітичною активністю, так і з термостабільністю шляхом спрямованої еволюції залишалися недосяжними для промислового застосування (Bingjie Zhang et al.,2023).

Отже, актуальним напрямком досліджень є вивчення біотехнологічних підходів, спрямованих на отримання мікробно синтезованих LOX, які характеризуються підвищеною каталітичною активністю та покращеною

термостабільністю. Такі дослідження мають важливе значення для сприяння широкому промислового використанню LOX (Bingjie Zhang et al.,2023).

Ферменти, які знаходять успішне промислове застосування, мають специфічні характеристики, а саме здатність підтримувати надійну каталітичну активність і стабільність у широкому спектрі діапазонів рН і температур. Лише ті ферменти, які відповідають цим суворим критеріям, можна вважати потенційними кандидатами для застосування в нових продуктах харчування. Варто зазначити, що властивості ліпоксигеназ (LOX) можуть значно відрізнятися залежно від їх джерела. LOX, отримані від *Anabaena* та *P. aeruginosa*, наприклад, демонструють низьку каталітичну активність, обмежену стабільність рН і проблеми з термостабільністю (Kalms та ін., 2017; Qian та ін., 2018). Qian та ін. ідентифікували LOX з *Mucosoccus xanthus*, який добре працював у кислих умовах (рН 3,0–6,0), але демонстрував низьку термостабільність ($t_{1/2}$, 50°C = 7,1 хв) і втратив свою каталітичну активність лише через 15 хвилин при 65 °C (Qian et al., 2017). Тоді як LOX від *Pleurotus* і *A. aegerita* показали вищу каталітичну активність, їх оптимальні температури реакції (20°C–35°C) є обмеженнями для промислового використання (Kuribayashi et al., 2002; Karrer and Ruhl, 2019). У цьому дослідженні мутант EnLOX, позначений як EAHNWG, що містить шість мутацій залишків, був отриманий за допомогою спрямованої еволюційної стратегії. Його питома активність досягла $330,17 \pm 18,54$ Од/мг, що свідчить про вражаюче збільшення у 8,25 разів порівняно з EnLOX дикого типу (Bingjie Zhang et al.,2023).

Однією з особливостей виробництва рекомбінантних ліпоксигеназ є індукція. Індукція в контексті синтезу ліпоксигенази – це процес стимуляції виробництва цього ферменту в клітині. Це досягається шляхом впливу на гени, відповідальні за синтез ліпоксигенази. За рахунок індукції ми можемо контролювати синтез ліпоксигеназ. Індукція дозволяє точно регулювати кількість ліпоксигенази, що виробляється. Це особливо важливо для

промислового виробництва, коли необхідно отримати велику кількість чистого ферменту. Неконтрольований синтез ліпоксигенази може призвести до окисного стресу в клітині. Індукція дозволяє уникнути цього, виробляючи фермент лише тоді, коли це необхідно. Ліпоксигенази – це ферменти, які каталізують окислення поліненасичених жирних кислот. У результаті цього процесу утворюються вільні радикали – високореактивні молекули, які можуть пошкоджувати клітинні структури, такі як ДНК, білки та ліпіди. Це явище називається окислювальним стресом. Індукція синтезу ліпоксигенази дозволяє контролювати виробництво ферменту. Тобто, ліпоксигеназа виробляється тільки тоді, коли це необхідно, а не постійно. Це дозволяє зменшити кількість вільних радикалів, якщо ліпоксигенази менше, то і вільних радикалів виробляється менше. Зменшення кількості вільних радикалів знижує ризик пошкодження ДНК, білків та ліпідів. Індукція допомагає підтримувати баланс між окислювальними та антиокислювальними процесами в клітині. Індукція може бути досягнена додаванням індуктора. Найпоширенішим індуктором є IPTG (ізопропіл- β -D-тіогалактозид) (Jing Lu et al., 2019). Також, як індуктор використовують гліцерин (Chiam Hashem et al., 2020). Індукована експресія дозволяє отримати високий вихід ліпоксигенази.

Таким чином, існуючі методи одержання ліпоксигеназ мають ряд недоліків. Наприклад, обмежена кількість і чистота: вміст ліпоксигеназ у природних джерелах (рослинах, тваринах) зазвичай низький, що ускладнює отримання великих кількостей ферменту високої чистоти; активність ліпоксигеназ може змінюватися залежно від умов вирощування рослин, сезону збору та інших факторів; отримані препарати часто містять домішки інших білків, що може ускладнювати їх подальше дослідження; процес ізоляції ліпоксигеназ з природних джерел зазвичай трудомісткий і важко масштабується для промислового виробництва. Рекombінантні технології можуть вирішити ці проблеми.

Оптимізація синтезу ліпоксигенази

Біологічний агент	Метод оптимізації і об'єкт	Активність ліпоксигенази	Джерело
<i>Enterovibrio norvegicus</i>	Для підвищення каталітичної активності за допомогою стратегії спрямованої еволюції відбиралися мутантні штами <i>Enterovibrio norvegicus</i> з підвищеною каталітичною активністю, які були створені за допомогою білкової інженерії. Так був одержаний мутантний штама <i>E. norvegicus</i> – продуцент EnLOX – ліпоксигенази з каталітичною активністю у 8,25 разів вищою, ніж активність EnLOX дикого типу	330,17 ± 18,54 Од/мг	Pang, C., Liu, S., Zhang, G. et al (2022)
<i>E. coli</i>	Сконструйована система автолізу в <i>E. coli</i> на основі гена лізису бактеріофага ФХ174-Е для посилення виробництва позаклітинних білків дозволила досягнути високоефективного позаклітинного продукування LOX шляхом оптимізації умов лізису клітини. Процес одержання LOX був масштабований у 5-літровому біореакторі.	368 ± 1,4 Од/мл	Zhang B, Chi H, Shen J et al (2023)

Enterovibrio norvegicus Для підвищення каталітичної активності за допомогою стратегії спрямованої еволюції відбиралися мутантні штами *Enterovibrio norvegicus* з підвищеною каталітичною активністю, які були створені за допомогою білкової інженерії. Так був одержаний мутантний штама *E. norvegicus* – продуцент EnLOX – ліпоксигенази з каталітичною активністю у 8,25 разів вищою, ніж активність EnLOX дикого типу 330,17 ± 18,54 Од/мг Pang, C., Liu, S., Zhang, G. et al (2022)

E. coli Сконструйована система автолізу в *E. coli* на основі гена лізису бактеріофага ФХ174-Е для посилення виробництва позаклітинних білків дозволила досягнути високоефективного позаклітинного продукування LOX шляхом оптимізації умов лізису клітини. Процес одержання LOX був масштабований у 5-літровому біореакторі. $368 \pm 1,4$ Од/мл Zhang B, Chi H, Shen J et al (2023)

1.4 Переваги рекомбінантних ліпоксигеназ

Рекомбінантні ліпоксигенази – це ферменти, отримані за допомогою методів генетичної інженерії. Вони відкривають нові можливості для досліджень та біотехнологічних застосувань завдяки різним перевагам. Наприклад, створення ферментів з новими функціями: шляхом спрямованої еволюції можна отримувати ліпоксигенази з новими субстратними специфічностями або каталітичними властивостями. (Bingjie Zhang et al.,2023).

Рекомбінантні дослідження ліпоксигеназ відкривають нові можливості для детального вивчення структури, функції та механізмів дії цих ферментів, що є важливим для розробки нових біотехнологічних продуктів. Далі представлені результати останніх досліджень, які демонструють потенціал рекомбінантних ліпоксигеназ.

На основі *Pseudomonas aeruginosa* сконструйовано рекомбінантний штам *Pichia pastoris* CBS7435 WT Mut. Для експресії PaLOX (ген, що відповідає за синтез ліпоксигенази) використовували вектор pBSY3S1Z. Штам *P. pastoris* CBS7435 WT MutS використовувався як штам-господар. Цей штам має адисфункціональний ген алкогольоксидази 1 (AOX1) і демонструє MutS метанол, що використовує повільний фенотип. Вектори експресії лінеаризували для інтеграції експресійної касети в геном *P. pastoris*. Клітини *P. pastoris* трансформували лінеаризованою плазмідною, відбирали колонії і культивували. Культивування рекомбінантного *P. pastoris* CBS7435 MutS

проводили як у 50 мл BMGY, так і в BMMY за Fischer et al. (2019). Основні культури індукували протягом 72 годин шляхом додавання 0,25 % гліцерину кожні 24 години для BMGY та 1 % метанолу кожні 12 годин для культивування BMMY. Клітини культивували при 28 °C і 130 об/хв. PaLOX, що містить супернатанти зі зразків, індукованих метанолом, продемонстрував значно меншою активністю, ніж зразки, індуковані гліцерином. Активність ферменту досяглася 11,6 Од/мг (Chiam Hashem et al., 2020).

На основі *Pseudomonas aeruginosa* створено рекомбінантний штам *E. coli* BL21(DE3). Ген LOX був ампліфікований за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з очищеної *P. aeruginosa*. Геномна ДНК ATCC27853 і антисмисловий праймер були розроблені на основі *P. aeruginosa* PAO1 LOX послідовності і були використані для клонування повнорозмірного гена LOX (pse-LOX). Ампліфікований фрагмент розміром 2,0 kb вставляли в рMD 19-T. Після секвенування, отримане похідне рMD 19-T, що кодує правильний ген LOX, було названо рMD19T-pse-LOX. Плазмиди рMD19T-pse-LOX і рЕТ-23а (b) були розщеплені. Отриманий фрагмент розміром 2,0 кб клонували в сайт BamH I рЕТ23а (b) для створення рЕТ-23а/pse-LOX. Рекомбінантну плазмиду рЕТ23а/pse-LOX трансформували в клітини *E. coli* BL21. Клітини BL21 (DE3), що містять плазмиду рЕТ-23а/pse-LOX, інокулюють у 30 мл середовище LB, що містить 100 мг/мл ампіциліну при 37 C. Для індукції IPTG експресії, 1 мл нічної культури рекомбінантного штаму інокулював у колбу на 250 мл, що містить 50 мл середовища LB. Суміш інкубували в а ротаційний шейкер при 180 об/хв, 37 0C. Коли клітини досягли експоненціального росту фаза, потім додавали IPTG (100 мг/мл), щоб індукувати фермент виробництво при 16 0 C протягом 44 год. Також пробували вирощувати культуру у середовищі з автоіндукцією: нічну культуру рекомбінантного штаму інокулювали у середовищі ZYM-5052, а потім інкубували в ротаційному шейкері з тими ж умовами (180 об/хв, 37 C). Середовище ZYM-5052 складається з 1% N-Z-аміну AS, 0,5% дріжджового екстракту, 0,05% глюкози, 0,5% гліцерину, 0,2%

лактози, 25 мМ Na₂HPO₄, 25 мМ KH₂PO₄, 50 мМ NH₄Cl, 5 мМ Na₂SO₄, змішаний розчин 2 мМ MgSO₄ і 0,2 слідов металу, 1000 розчин складався з змішаних слідов металу 50 мМ FeCl₃, 20 мМ CaCl₂, 10 мМ MnCl₂, 10 мМ ZnSO₄, 2 мМ 20 CoCl₂, 2 мМ CuCl₂, 2 мМ CuCl₂, NiCl₂, 2 мМ Na₂MoO₄ та 2 мМ H₃BO₃. Коли оптична щільність культури при 600 нм досягла 0,6, температуру знизили до 16°C і продовжували струшувати при 180 об/хв протягом 44 годин. Вища активність ферменту спостерігалася в середовищі з автоіндукцією, вона дорівнювала 23,850 Од/мл (що відповідає рівень експресії 264 мг чистого білка/л бактеріальної культуральної рідини) і клітинна біомаса 5,952 г DCW/л (Jing Lu et al., 2019).

Гени *Anabaena* sp. PCC 7120 експресували у *Bacillus subtilis*. Використовувався рMD19-Т вектор для клонування. Всі вектора для експресії ana-rLOX у WB800 є рHB201 похідні. рHP43 і рHP43R були створені за допомогою рHB201, човникової плазмиди з криптичної плазмиди *B. subtilis* рТА1060 і плазмиди *E. coli* рUC19. Експресійна касета PamyE-PrsA була створена шляхом сплайсингу за допомогою ПЛР з розширеним перекриттям з використанням праймерів P5/P6/P7/P9, а потім вставлено в рHP43 для створення рHP43R. Послідовність сигнального пептиду SamyQ або SnprB була ампліфіковано методом ПЛР з геномної ДНК *B. subtilis* 168 з використанням праймери SamyQ-F/SamyQ-R або SnprB-F/SnprB-R, а також вставлено в BamHI/EcoRI-подвійно перетравлений рHP43R і рHP43 для генерації рHPSQ, рHPSB і рHPSBR для секретованої експресії. Рекомбінантні плазмиди рHPSQ-ana-LOX, рHPSB-anaLOX і рHPSQR-ana-LOX були електротрансформовані в *B. subtilis* WB800 і культивували при 15 °C у суперзбагаченому середовищі (25 г/л триптози, 20 г/л дріжджового екстракту, 30 г/л глюкози та 3 г/л K₂HPO₄, рН 7,0) містить хлороміцетин (10 мкг/мл) і еритроміцин (3 мкг/мл). Культуру інкубували на ротаційному струшуванні протягом 96 годин. SnprB сигнальний пептид був більш ефективним, ніж SamyQ, у спрямуванні секреція

ana-rLOX. Максимальна активність була в культурі 76 Од/мл (171,9 мкг/мл) з вектором експресії pHPSBR-ana-LOX (Chong Zhang et al., 2019).

Гени *Pleurotus sapidus* експресували у *Pichia pastoris*. Ген LOX1 ампліфікували методом ПЛР з використанням вектора pColdValOx. ПЛР проводили за допомогою ДНК-полімерази Pfu. Продукти ПЛР-ампліфікації та плазмідні розщеплювали відповідними рестрикційними ферментами лігування з використанням лігази призвело до векторів експресії pPIC9 K-LOX1, pPIC9 K-HIS-LOX1, pPIC9 K-KHIS-LOX1, pPIC9 K-HIS-LOX1D1_459 і pPICZaA-HIS-LOX1, які були трансформовані в *E. coli* TOP10 за стандартним протоколом. Після розмноження векторів у *E. coli* TOP10, вектори були виділені та виконано розширене гаряче секвенування ДНК для перевірки плазмідних конструкцій. *P. pastoris* SMD1168 трансформували лінеаризованими векторами SacI шляхом електропорації. Основну культуру інкубували при 220 об/хв і 30 °C протягом 48 год. *P. pastoris* pPIC9K-LOX1 і pPIC9K-HIS-LOX1 не показують активність Lox1, а штам *P. pastoris* pPIC9K-KHIS-LOX1 продукував Lox1 внутрішньоклітинно, експресійну плазмідну pPICZaA використовувався як альтернатива для клонування LOX1. У поточній роботі експресійна плазмідна pPICZaA-HIS-LOX1 був сконструйований і трансформований у *P. pastoris* SMD1168. Очищений фермент продемонстрував активність 111 Од /мг (Akiko Sugio et al., 2014).

Було досліджено експресію генів *Enterovibrio norvegicus* DSM 15893 у *E. coli* BL21. Кодуючий ген LOX з *E. norvegicus* DSM 15893 був оптимізований за кодоном і клонований у плазмідну pET-28a (+) з Nde I та Xho I як вставленими сайтами. Комбінацію *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a-EnLOX інокулюють у середовище Luria Broth (LB), що містить 100 мкг мл⁻¹ канаміцину при 37 °C і швидкості перемішування 180 об/хв, поки оптична густина при 600 нм не досягне 0,6–0,8. Остаточна концентрація 100 мкг мл⁻¹ IPTG була додана для індукції експресії білка при 16 °C протягом 16 годин. Питома активність очищеного EnLOX становила 40,34 Од/мг⁻¹ (Bingjie Zhang et al., 2022).

Гени *Mucococcus xanthus* експресували у *E. coli* ER2566. *M. xanthus* DK 1622, *Escherichia coli* ER2566 і pET-28a використовували як джерело геномної ДНК, клітини-господарі та вектор експресії відповідно. Послідовності праймерів із сайтами рестрикції EcoRI та NotI, розробленими на основі послідовності ДНК передбачуваного LOX з *M. xanthus*, використовували для клонування генів. Ген, що кодує передбачувану LOX ампліфікували за допомогою ПЛР з використанням геномної ДНК *M. xanthus* як матриця та полімераза Taq. ДНК фрагмент лігували з вектором pET-28a і трансформували в *E. coli* ER2566. Рекомбінантну *E. coli* висівали на агар Лурія-Бертані (LB) містить 0,1 мМ канаміцину, була відібрана колонія, стійка до антибіотиків. Активність ферменту досягла 24 Од/мг (Jung-Ung An et al., 2018).

Гени *Burkholderia thailandensis* було експресовано у *E. coli*. Ген лінолеат-13-ліпоксигенази був клонований у *E. coli* ER2566, на основі ДНК послідовності передбачуваної ліпоксигенази з *B. thailandensis*. Клітини, що експресують лінолеат-13-ліпоксигеназу з *B. thailandensis*, збирали з культурального бульйону центрифугуванням при 13000×g протягом 20 хв при 4 °С, промивають фізіологічним розчином і потім ресуспендують у 50 мМ фосфатному буфері (рН 8,0), що містить 300 мМ NaCl, 10 мМ імідазолу та 0,1 мМ фенілметилсульфонілфториду. Ресуспендовані клітини руйнувалися ультразвуковим апаратом на льоду протягом 2 хв. Непорушені клітини і клітина дебрис видаляли центрифугуванням при 13000×g протягом 20 хв при 4 °С, і супернатант використовували як сирий продукт ферменту, який фільтрували через пору з розміром 0,45 мкм фільтр. Фільтрат наносили на хроматографічну колонку His-Trap HP. Спостерігали максимальну активність рекомбінантних клітин, що експресують лінолеат-13-ліпоксигеназу з *B. thailandensis*, для продукції 13-HODE з лінолевої кислоти, вона дорівнювала 26.4 Од/мг (Dong-Hyun Sim et al., 2015).

Гени *Mucococcus xanthus* було експресовано у *E. coli*. Повнорозмірний ген rMxLOX був виділений та клонований у pET-28a для створення плазміди

експресії рЕТ-28a/rMxLOX, яку було трансформовано в *E. coli* BL21 (DE3). Клітини *E. coli* вирощували у 100 мл середовища LB, що містило кінцеву концентрацію канаміцину 50 мкг/мл, при 37°C, та додавали IPTG до концентрації 100 мкг/мл, коли OD600 становила 0,6-1,0. Потім культури *E. coli* інкубували при 16°C протягом ночі для індукції експресії рекомбінантного білка. Клітини збирали центрифугуванням при 8000 × g протягом 10 хвилин, а осад ресуспендували в 10 мл лізуючого буфера (50 mM PBS, pH 8,0, та 0,3 M NaCl) та лізували ультразвуком (400 Вт, обробка ультразвуком протягом 2 секунд, зупинка на 1 секунду) протягом 15 хвилин. Неочищений екстракт потім центрифугували при 8000 × g протягом 10 хвилин при 4°C для відділення клітинного дебрису. N-кінцевий гістидин-мічений rMxLOX очищали з розчинної фракції за допомогою афінної смоли Ni²⁺-NTA. Хроматографічну колонку врівноважували за допомогою врівноважувального буфера (50 mM PBS, pH 8,0, та 0,3 M NaCl). Для видалення всіх домішок використовували промивний буфер (10 mM імідазолу, 50 mM 97 PBS pH 8,0 та 0,3 M NaCl), застосовуючи приблизно 10 об'ємів колонки 98. rMxLOX елюювали за допомогою елюційного буфера (200 mM імідазолу, 50 mM PBS pH 8,0 та 0,5 M 99 NaCl). Активність дорівнює 9.5×10³ Од/мг. (Hui Qian, Bingjie Xia et al., 2017).

Гени *Fusarium oxysporum* було експресовано у *E. coli*. Ген FoxLOX (номер доступу Broad Institute FOXG_04807) був ампліфікований з кДНК гриба за допомогою набору ExTaq Polymerase Kit (TaKaRa Biotechnology) і наступних праймерів, що містять сайти розпізнавання NheI та NotI відповідно: 5'-ACGGCTAGCATGGCAACAGAAGCTCCTTTAGCAC-3' (сенс) і 5'-ACGGCGGCCCGCCTAAATCAAGATAGAAACCGCGG-3' (антисмисловий). Використовували наступні умови ПЛР: 98°C протягом 3 хвилин, потім 30 циклів 98°C протягом 30 секунд, 55°C протягом 30 секунд і 72°C протягом 2,5 хвилин. ПЛР припиняли через 5 хвилин при 72°C. Отриманий фрагмент субклонували в рJET2.1/blunt. Для функціональної експресії FoxLOX

клонували у вектор рЕТ28а (отримавши плазмиду рЕТ28а/FoxLOX) і трансформували в клітини *E. coli* BL21star (Invitrogen). Рекombінантні клітини культивували при 37°C до OD 600 0,6–0,8 або в середовищі LB, або в бульйоні 2xYT. Експресію індукували додаванням 0,1 мМ ізопропіл β -D-тіогалактопіранозиду. 0,1 мМ цитрату заліза амонію додавали в момент часу індукції, щоб переконатися, що експресія LOX не обмежена через низьку концентрацію кофактора. Клітини культивували протягом 3 днів при 16°C при постійному струшуванні та збирали центрифугуванням (8000×g, 20 хв, 4°C). Отриманий осад заморожували в рідкому азоті та зберігали при –20°C. Активність дорівнює 0.8 Од/мг (Florian Brodhun, Alvaro Cristobal-Sarramian et al., 2013).

Гени *Shewanella woodyi* ATCC 51908 було експресовано у *Escherichia coli* BL21. Ізольовану колонію бактерій, що містять плазмиди, що цікавлять, вирощену на чашках із середовищем LB зі специфічним антибіотиком, інокулювали у 50 мл відповідного рідкого середовища, що також містить відповідний антибіотик. Цей інокулят інкубували при температурі 37°C з перемішуванням (150 об/хв) протягом приблизно 24 годин. Після цього часу цю культуру інокулювали в концентрації 5% у нову культуру, яку також вирощували з середовищем LB, що містило відповідний антибіотик, при 37°C з перемішуванням (150 об/хв) до досягнення Abs600nm приблизно 0,4. Після досягнення бажаної абсорбції індуктор IPTG додавали в кінцевих концентраціях від 0,015 мМ до 1 мМ. Зразки інкубували за температури від 16°C до 37°C, перемішуючи (150 об/хв) протягом 18 годин. Зразки центрифугували протягом 20 хвилин при 8000 g за 4°C, супернатант видаляли, а клітини суспендували у відповідному буфері та зберігали при -20°C. Збережені клітини розморожували та піддавали обробці ультразвуком потужністю 60 Вт протягом 3 циклів по 60 секунд у сонікаторі Branson/250 для лізису. Після лізису їх центрифугували протягом 40 хвилин при 8000 g за 4°C, зібраний супернатант (так званий SN1) та осад суспендували у 60 мл 0,5 М

натрій-фосфатного буфера, рН 7,5, у випадку рекомбінантного ферменту SWAraсLOX, та 0,2 М боратного буфера, рН 8,0, у випадку SWPrecLOX, з N-лаурилсаркозином у пропорції 0,2% детергенту. Зразок інкубували при 23°C, 150 об/хв протягом 16 годин та центрифугували при 8000 g протягом 40 хвилин, утворюючи фракції SN2 (другий супернатант) та P2 (другий осад). Для всіх протестованих умов паралельно інкубували два різні контрольні зразки, що склалися зі штаму *E. coli* без присутності рекомбінантної плазмиди, який піддавався тим самим умовам температури та концентрації індуктора, що й робочий матеріал, та рекомбінантного клону (що містив плазмиду з геном ліпоксигенази), але без індукції за допомогою IPTG. Активність дорівнює 25.36 Од/мг (Jhoanne Hansen Orientador et al., 2013).

Експресія рекомбінантної ліпоксигенази з *Nicotiana benthamiana* у *Saccharomyces cerevisiae*. Повнорозмірні відкриті рамки зчитування Nb-9-LOX, C113-HPL та Cm-9/13-HPL були вирізані з векторів pGEM-T (сконструйованих, як описано вище) та клоновані у вектори pYES2 (Invitrogen, Карлсруе, Німеччина) для отримання pYES2-Nb-9-LOX, pYES2-C1-13-HPL та pYES2-Cm-9/13-HPL. Крім того, ці три конструкції були трансформовані у штам *S. cerevisiae* INVSc1 для експресії рекомбінантного білка, як описано [12]. Дослідження експресії генів Nb-9 LOX, C113-HPL та Cm-9/13-HPL у дріжджах проводилися шляхом збору аліквоти клітин через 0, 4, 8 та 24 години після індукції галактозою. Активність дорівнює 0.9 Од /мл (Fong-Chin Huang and Wilfried Schwab, 2011)

Експресія рекомбінантної ліпоксигенази з *Pseudomonas aeruginosa* у *Escherichia coli* JM109. Щоб експресувати LOX, нічну культуру рекомбінантних штамів *E. coli* LOX-E у середовищі LB субкультивували в середовищі самоіндукції при 37 °C і 220 об/хв. Температуру ферментації знижували до 25 °C, коли щільність клітин досягала 0,6, і клітини культивували при 220 об/хв для експресії рекомбінантного LOX. Після 1–6 годин індукції додали арабінозу, щоб індукувати експресію ФХ174-Е.

Методом оцінки кількості клітин і щільності клітин є використання вимірювань оптичної густини (OD) на довжині хвилі 600 нм (OD 600). Умови експресії та індукції L-RhaM і SDH були такими ж, як і для LOX. Рекомбінантні штами *E. coli* використовували для збільшення ферментації в 5-літровому ферментері (Eppendorf NBS, США) з 2,5 л середовища самоіндукції, 100 мкг·мл⁻¹ ампіциліну та стрептоміцину. А 10% (об./об.); посівну культуру в середовищі LB інокулювали в середовище самоіндукції для культивування. Швидкість перемішування бродіння становила 400 об/хв, а об'єм вентиляції становив 2,5 об./хв. Після інкубації при 37 °С протягом 2 годин температуру бродіння знизили до 25 °С. Коли щільність штаму культивували до оптичної густини при 600 нм (OD 600) 7, експресію ФХ174-Е індукували 0,6 мМ арабінози при 25 °С. Через низьку ефективність секреції LOX, опосередкованої сигнальними пептидами, була сконструйована система автолізу *E. coli* для покращення позаклітинного виробництва LOX. Ген E з бактеріофага ФХ174, що кодує поліпептид з 91 амінокислотою, викликає лізис *E. coli* після фагової або гетерологічної експресії. Таким чином, тут експресія ФХ174-Е регулювалася арабінозним опероном у *E. coli* BL21-174E для вивчення позаклітинного виробництва цільового білка. Потім для позаклітинної продукції LOX використовували автолітичну систему *E. coli* BL21. Найвищий вихід позаклітинного LOX у *E. coli* становив до $368 \pm 1,4$ U·mL⁻¹ за оптимізованих умов автолізу та ферментації. (Cuiping Pang, Song Liu et al., 2022)

Ген міні-ліпоксигенази з ціанобактерій *Nostoc sphaeroides* (NsLOX) був клонований і експресований у *E. coli* BL21. Для визначення властивостей NsLOX було підвищено експресовано в *E. coli* BL21 (DE3)-хазяїні. Після лізису клітин активність по відношенню до LA NsLOX досягла $6728 \pm 180,13$ Од/мл, з видимою смугою близько 54 кДа, що містить NsLOX (52 кДа) і мітку (2 кДа) у SDS-PAGE (рис. 4 , таблиця 1), яка демонструє молекулярну масу, подібну до молекулярної маси *Nostoc sp.* LOX 52 кДа. Однак він був набагато

нижчим, ніж LOXs від рослин і тварин (75-104 кДа) і трохи вище, ніж LOX від *N. punctiforme* (45 кДа). Питома активність по відношенню до LA NsLOX (78 080 ОД/мг) була в 47,38 разів вищою, ніж у неочищеного ферменту (таблиця 1), який був особливо набагато вищим, ніж у LOX з *Anabaena* sp. PCC 7120 (30 000 ОД/мг) і *M. xanthus* (56 000 ОД/мг). Оскільки низька питома активність потребує більше витрат для промислового застосування, NsLOX з високою питомою активністю, у нашому дослідженні, може подолати цей недолік. Активність дорівнює 78 080 ОД/мг (очищений фермент). (Bread. Int. J. Mol. Sci. et al., 2023)

Експресія та характеристика *Pseudomonas aeruginosa* LOX у *Escherichia coli*. p18T-pLOX був подвійно перетравлений за допомогою NdeI та HindIII. Отриманий фрагмент LOX був клонований у сайти NdeI–HindIII pET 22b(+) для отримання pET-22b(+)/pre-LOX. p18T-spLOX був подвійно перетравлений за допомогою NcoI та HindIII. Отриманий фрагмент LOX був клонований у сайти NcoI–HindIII pET-22b(+) для отримання pET-22b (+)/pelb-LOX. Потім дві плазміди були трансформовані в *E. coli* Rosetta (DE3) для експресії LOX. Одну колонію клітин *E. coli* Rosetta (DE3), що містила плазмиду pET-22b(+)/pre-LOX, інокулювали у 25 мл середовища Лурії-Бертані, що містило 100 мкг/мл ампіциліну та 34 мкг/мл хлорамфеніколу при 37 °С. Нічну культуру рекомбінантного штаму (200 мкл) потім інокулювали у 25 мл середовища terrific bullon (TB), що містило таку ж кількість антибіотиків, у шейкері об'ємом 250 мл та інкубували на роторному шейкері (200 об/хв) при 37 °С, доки його оптична густина при 600 нм (OD600) не досягла 0,6. IPTG додавали до кінцевої концентрації 1 мМ для індукції експресії цільового білка. Індукцію білка проводили при 20 °С та продовжували протягом 50 годин. Зразки відбирали щогодини та аналізували на OD600 та активність ферментів. Активність дорівнює 28,3 ОД/мг (Xinyao Lu, Juan Zhang et al., 2013)

Посилення активності ліпоксигенази (LOX), що виробляється рекомбінантною *E. coli* за рахунок оптимізації умов ферментації. Потрібно

перенести рекомбінантні бактерії (-70°C), збережені в пробірках з гліцерином, на планшет LB і культивуйте при постійній температурі 37°C. Після того, як одна колонія виросте на планшеті, перенесіть одну колонію в 250 мл колбу для струшування, що містить 50 мл середовища LB, і культивуйте її при 37 °C і 180 об/хв протягом приблизно 12 годин, доки не буде використана логарифмічна фаза. Культивовану посівну рідину додавали до ферментаційного середовища, струшували та культивували при 37°C та 180 об/хв до певної щільності бактерій, а потім культивували за заданих умов ферментації. Активність дорівнює $21\,261,60 \pm 264,03$ Од/мл. (He Yujun, Zhang Chong et al., 2016)

Таблиця 1.3

Експресія рекомбінантної ліпоксигенази

Мікроорганізм-донор	Мікроорганізм-хазайн	Експресовані гени	Вектор	Активність LOX на основі експресованих генів	Джерело
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pichia pastoris</i> CBS7435 WT Mut	PaLOX	pBSY3S1 Z	11.6 Од/мг	Chiam Hashem et al., 2020
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>E.coli</i> BL21(DE3)	LOX	pET23a/ps e-LOX	23,850 Од/мл	Jing Lu et al., 2019
<i>Anabaena sp.</i> PCC 7120	<i>Bacillus subtilis</i> WB800	LOX	pHPSBR-ana-LOX	76 Од/мл	Chong Zhang et al., 2019
<i>Pleurotus sapidus</i>	<i>Pichia pastoris</i>	LOX1	pPICZaA-HIS-LOX1	111 Од /мг	Akiko Sugio et al., 2014
<i>Enterovibrio norvegicus</i> DSM 15893	<i>E. coli</i> BL21	LOX	pET-28a (+) з Nde I та Xho I	40,34 Од/мг ⁻¹	Bingjie Zhang et al., 2022
<i>Mucococcus xanthus</i>	<i>E. coli</i> ER2566	LOX	pET-28a	24 Од/мг	Jung-Ung An et al., 2018
<i>Burkholderia thailandensis</i>	<i>E. coli</i> ER2566	LOX	-	26 Од/мг	Dong-Hyun Sim et al., 2015

Продовження таблиці 1.3

<i>Mycococcus xanthus</i>	<i>E. coli</i> BL21	rMxLOX	pET-28a	9.5×10 ³ Од/мг	Hui Qian, Bingjie Xia et al., 2017
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>E. coli</i>	FoxLOX	pET28a	0.8 Од/мг	Florian Brodhun, Alvaro Cristobal - Sarrami an et al., 2013
<i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908	<i>Escherichia coli</i> BL21	LOX	-	25.36 Од/мг	Jhoanne Hansen Orientador et al., 2013
<i>Nicotiana benthamiana</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	LOX	pYES2	0.9 Од /мл	Fong-Chin Huang and Wilfried Schwab, 2011
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LOX	-	368 ± 1,4 Од/мл	Cuiping Pang, Song Liu et al., 2022
<i>Nostoc sphaeroides</i>	<i>E. coli</i> BL21	NsLOX	-	78 080 Од/мг(очищений фермент)	Bread. Int. J. Mol. Sci. et al., 2023
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	LOX	pET-22b(+)/pre-LOX	28,3 Од/мг	Xinyao Lu, Juan Zhang et al., 2013

Закінчення таблиці 1.3

-	<i>E. coli</i> pET-23a-pse-LOX	LOX	pET-23a-pse-LOX	21 261,60 ± 264,03) Од/мл	He Yujun, Zhang Chong et al., 2016
---	--------------------------------	-----	-----------------	------------------------------	------------------------------------

Також, висока продуктивність: шляхом оптимізації умов культивування та генетичної конструкції можна досягти високої продуктивності ферменту. *Escherichia coli* є одним із найбільш широко використовуваних мікроорганізмів-господарів для експресії рекомбінантного білка; однак його слабка здатність до позаклітинної секреції перешкоджає ефективному виробленню рекомбінантних білків у позаклітинне середовище. Щоб полегшити подальшу характеристику та застосування LOX, підвищення ефективності його секреції з кишкової палички є головною проблемою, яку необхідно вирішити (Cuiping Pang et al., 2022).

Секреція рекомбінантного білка за допомогою сигнального пептиду є звичайним методом, який використовується для позаклітинного виробництва. Виділення позаклітинного білка може бути досягнуто шляхом часткового руйнування або модифікації зовнішньої мембрани або клітинної стінки для проникнення за допомогою фізико-хімічних методів (наприклад, ультразвук/Triton X-100) або ферментативної обробки (наприклад, лізоциму). Втручання в пептидоглікан клітинної стінки та мембранну мережу за допомогою штамової інженерії також може ефективно посилити секрецію позаклітинного білка *E. coli* (Cuiping Pang et al., 2022).

Ген лізису ФХ174-Е бактеріофага з одноланцюговою ДНК кодує трансмембранний пороутворюючий білок, який може розщеплювати мембрану клітини-хазяїна, щоб індукувати витік внутрішньоклітинних білків. Його

трансмембранна структура утворюється шляхом взаємодії білка лізису з цільовими білками, які беруть участь у синтезі клітинної стінки *E. coli*. Залежно від експресії білків лізису бактеріальних фагів клітинна мембрана може бути ослаблена або повністю лізована, що сприяє подальшим процесам вивільнення білка. Потім утворюється «порожня клітина» з майже неушкодженими клітинними стінками після вивільнення її клітинного вмісту назовні. Цей метод було ефективно використано для позаклітинного виробництва β -глюкуронідази та амадоріази. Ця система автолізу має більше переваг, ніж більшість інших методів, включаючи простоту експлуатації та економічну ефективність для виробництва позаклітинного білка (Cuiping Pang et al., 2022).

Було прийнято кілька стратегій для покращення позаклітинної секреції LOX на основі сигнальних пептидів і проникності клітинної стінки *E. coli*. Зокрема вивчався вплив сигнальних пептидів на секрецію LOX, що незначно збільшило секреторну здатність LOX. Хоча поверхнево-активні речовини можуть збільшити проникність клітинної мембрани для сприяння секреції LOX, позаклітинний вихід LOX не може відповідати вимогам промислового виробництва. Згодом була сконструйована система автолізу в *E. coli* на основі гена лізису бактеріофага ФХ174-Е для посилення виробництва позаклітинних білків. Таким чином, було досягнуто позаклітинного виробництва LOX і зменшено вміст тілець включення в клітині шляхом оптимізації умов лізису клітини. Вихід позаклітинного LOX досяг $368 \pm 1,4$ U мл⁻¹ в 5-літровому біореакторі за оптимізованих умов лізису, тобто часу індукції та температури (Cuiping Pang et al., 2022).

Рекомбінантні ліпоксигенази часто демонструють вищу каталітичну активність порівняно з природними аналогами, що дозволяє прискорити біохімічні процеси. Також, ліпоксигенази покращують смакові якості продуктів (наприклад, м'яса, хліба) шляхом окислення ліпідів.

Ізоферменти LOX виробляються в зародках пшениці, хоча і в обмежених кількостях. Важко отримати велику кількість LOX із зародків пшениці, а вплив ізоферментів LOX на білки пшениці досі майже невідомий. У науковій літературі розглядаються результати експериментів щодо можливостей одержання і використання рекомбінантних LOX, які мають рослинне походження, але експресовані у мікробні клітини-господарі. Так, автори Shunsuke Takahashi et al., 2024 зосередилися на LOX III пшениці, яка має сильніший вплив на якість хліба, ніж LOX I або LOX II. Було експресовано рекомбінантний LOX III у гетерологічних пекарських дріжджах-господарях (*S. cerevisiae*), використовуючи систему експресії білка. Рекомбінантний LOX III, експресований у дріжджах, екстрагували шляхом подрібнення кульок і використовували як сирий екстракт у цьому дослідженні. Використання дріжджів, незамінного компонента бродіння тіста, гарантує, що сирі екстракти, що містять рекомбінантний LOX III, не матимуть шкідливого впливу на вторинну обробку борошна. Активність рекомбінантного LOX III оцінювали за допомогою ферментативного аналізу LOX, і було встановлено, що значення K_m для рекомбінантного LOX III становить 25,7 мкМ, з V_{max} 0,45 Од/мкл. Значення K_m для ферментів LOX від різних видів, отримані для лінолевої кислоти, були такими: 0,24 мМ для очищеного LOX з насіння люпину 0,06 мМ для очищеного LOX I та 0,18 мМ для очищеного LOX II з ячменю, 0,44 мМ для очищеного LOX із насіння гороху, 2,33 мМ для неочищеного екстрагованого LOX зі свіжого зеленого горошку та 11,2 мкМ для очищеного LOX I із сої (Shunsuke Takahashi et al., 2024).

Ці рекомбінантні ферменти продемонстрували чіткі кінетичні властивості та продемонстрували каталітичну активність щодо субстратів лінолевої кислоти, що свідчить про їх функціональну ефективність. Крім того, застосування цих рекомбінантних ферментів до пшеничного борошна виявило вплив білкового складу глютеніну. Рекомбінантні LOX III і Mini-LOX III, експресовані

дріжджами, можуть служити ефективними інструментами для зміни поліпептидного складу глютеніну в тісті, що є перспективним для покращення якості продуктів на основі зернових. Ці відомості сприяють глибшому розумінню ферментативних процесів, залучених у виробництво продуктів харчування зі зернових культур, і пропонують нові шляхи для покращення текстури та якості продуктів на основі борошна (Shunsuke Takahashi et al., 2024).

1.5 Особливості створення рекомбінантних штамів продуцентів ліпоксигеназ

Особливістю виробництва ліпоксигеназ рекомбінантними штамми є використання канаміцину. Канаміцин – це антибіотик широкого спектру дії. Для отримання штамів, що продукують ліпоксигеназу, в клітину вводять плазмиду (кільцеву молекулу ДНК) з геном ліпоксигенази та геном резистентності до канаміцину. Клітини, що успішно інкорпорували плазмиду, стають резистентними до канаміцину. Коли такі клітини вирощують на середовищі з канаміцином, виживають лише ті, що несуть плазмиду з геном резистентності, а отже, і з геном ліпоксигенази. Канаміцин токсичний для багатьох бактерій, але не для клітин еукаріотів, що часто використовуються як господарі для експресії чужорідних генів (Bingjie Zhang et al., 2022).

Отже, рекомбінантні ліпоксигенази відкривають нові горизонти в біотехнології, наукових дослідженнях та фармацевтиці. Завдяки можливості точного контролю над процесом їх отримання та модифікації властивостей, ці ферменти мають ряд значних переваг перед природними аналогами. Висока чистота та однорідність забезпечують стабільні результати в дослідженнях та промислових процесах. Модифікація властивостей відкриває широкі можливості для створення ферментів з заданими характеристиками

РОЗДІЛ 2. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ ЛІПОКСИГЕНАЗИ

2.1. Вибір субстрату для синтезу ліпоксигеназ

Найчастіше використовуваними субстратами для ліпоксигеназ є поліненасичені жирні кислоти, які містять цис,цис-1,4-пентадієнові структури. Серед них найвідомішими є лінолева кислота (це одна з найпоширеніших поліненасичених жирних кислот в рослинних оліях), арахідонова кислота (ця кислота є основним субстратом для ліпоксигеназ в тваринних клітинах), лінолева та олеїнова. Для вивчення механізму дії певного ферменту використовують чистий і добре охарактеризований субстрат.

У дослідженні (Chong Zhang et al., 2019) специфічність ana-rLOX досліджували за допомогою різних субстратів, включаючи лінолеву кислоту, ліноленову кислоту та арахідонову кислоту при 1,6 мМ. Кінетичні константи (K_m , V_{max}) вимірювали з використанням умов аналізу ферментативної активності. Для визначення впливу продукту на ферментативну реакцію в реакційну систему додавали різні концентрації продукту реакції 9R-гідропероксиду (з лінолевою кислотою як субстратом). Стабільність ферменту визначали при кімнатній температурі протягом різного часу зберігання. Визначено активність LOX на різноманітних субстратах. Лінолева кислота є найкращим субстратом для цього ферменту. Відносна активність щодо лінолевої кислоти арахідонової кислоти становила 54%, а ліноленової кислоти – 38%. V_{max} , K_m і K_{cat} для каталізу окислення лінолевої кислоти ana-rLOX були розраховані як 210,5 Од/хв.

					НУХТ БТЕК 02.01.19 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Піхало В. О.				Розділ 2. Біотехнологічні особливості синтезу та післяферментаційного виділення та очищення ліпоксигенази	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Красінько В.О.						41	1 41
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Специфічність очищеного ферменту досліджували з використанням ряду різних жирних кислот з точки зору положення та кількості подвійних зв'язків. Відносна активність у відсотках визначається як активність LOX на субстраті порівняно з активністю на найкращому досліджуваному субстраті лінолевої кислоти. В умовах аналізу фермент продемонстрував переважну активність по відношенню до аналогів ненасичених жирних кислот олеїнової кислоти, причому найвища активність була виявлена з лінолевою кислотою як субстратом 100%, потім ліноленою кислотою 60,4% і олеїновою кислотою 46,2% (**M. Busquets et al., 2004**).

Можна зробити висновок виходячи з попередніх досліджень, що найкращим субстратом для синтезу ліпоксигенази є лінолева кислота.

2.2. Виділення і очищення ліпоксигеназ після ферментації

Очищення LOX в більшості випадків відбувається за допомогою нікель-афінної хроматографії

Супернатант рекомбінантного LOX осадили сульфатом амонію, а осад розчинили в 0,05 М трис-НСІ (рН 7,5). Фракцію з найвищою активністю завантажували на колонку DEAESephacel, урівноважену в 0,05 М Tris–НСІ (рН 7,5), і зв'язаний білок елюювали градієнтом NaCl від 0 до 0,8. Фракції з активністю LOX збирали і завантажували на колонку Sephadex G-100. Потім активну фракцію партіями завантажували на 2-мл заряджену нікелем NTA агарозну колонку (Pruibest, Шанхай, Китай), яка була попередньо врівноважена буфером для лізису. Експресію та чистоту LOX контролювали за допомогою електрофорезу в додецилсульфаті натрію в поліакриламідному гелі (SDS-PAGE) з 5% накопичувальним гелем і 10% розділовим гелем. Очищений LOX гідролізували 6 М HCl при 110 °C протягом 24 годин (**Chong Zhang et al., 2019**).

Білок LOX очищали за допомогою афінної хроматографії на нікелевій колонці. Конкретний процес був наступним: супернатант ферментації збирали центрифугуванням при $12000\times g$ при 4°C протягом 30 хв після лізису клітин, а потім фільтрували за допомогою змішаних целюлозних мембран $0,22\ \mu\text{m}$. Нікель-афінну хроматографію (з використанням необробленої колонки His Trap TM FF, GE Healthcare) проводили шляхом промивання кульок 5–10 об'ємами колонки дистильованою водою для видалення консервантів і врівноваження колонки 5–10 об'ємами колонки буфера для зв'язування (20 мМ фосфатний буфер, 20 мМ K_2HPO_4 і KH_2PO_4 , pH 7,4). Зразок завантажували в колонку для хроматографічної афінності з нікелем, попередньо врівноважену буфером А (20 мМ фосфатний буфер, 20 мМ K_2HPO_4 і KH_2PO_4 , pH 7,4). Після повторного врівноваження гетеробілок елюював 15% буфером В (20 мМ фосфатний буфер, 20 мМ K_2HPO_4 і KH_2PO_4 , 500 мМ імідазол, pH 7,4). Цільовий LOX елюювали 25% буфером В, а потім діалізували протягом ночі при 4°C у попередньо охолоджену буфері А, щоб отримати чистий білок. Це було тоді необхідно сконцентрувати розбавлений опріснений LOX зразок із пробіркою для концентрації для наступних аналізів (Cuiping Pang et al., 2022).

Білки очищали за допомогою нікель-афінної хроматографії з використанням протоколу гравітаційного потоку для колонки NiSephарose 6 Fast Flow від GE Healthcare. Колонку врівноважували 10 CV буфера для зв'язування (50 мМ NaH_2PO_4 , pH 7,0, 300 мМ NaCl і 10 мМ імідазолу). Приблизно 240 мл концентрованого супернатанту культури αPaLOX від індукованого гліцерином культивування наносили на колонку. Колонку промивали буфером для зв'язування та буфером для промивання, що містить 30 мМ імідазолу, і елюювали буфером для елюції, що містить 300 мМ імідазолу. Фракції, які містили білок, об'єднували і концентрували до об'єму приблизно 2,5 мл. Заміну буфера проводили за допомогою ексклюзійної хроматографії з використанням колонок

PD-10 (GE Healthcare). Цю колонку врівноважували 100 мМ натрій-фосфатного буфера, рН 7,4. Фракції збирали і зберігали на льоду перед подальшим аналізом (**Chiam Hashem et al., 2020**).

Зібрані клітини ресуспендували в буфері для лізису, який складався з 50 мМ калій-фосфатного буфера (рН 6,0), 300 мл/л гліцерину, 3 мл/л Triton X-100 і 5 мМ імідазолу, а потім розбивали ультразвуком. Залишки клітин видаляли центрифугуванням. Розчинну фракцію порційно завантажували на 2 мл заряджену нікелем NTA агарозну колонку, яка була попередньо врівноважена буфером для лізису. Цільовий білок елюював імідазолом у діапазоні 100–150 мМ. Активні фракції об'єднували і діалізували проти 10 мМ калій-фосфатного буфера (рН 6,0). Чистоту LOX контролювали за допомогою SDS-PAGE (5% накопичувального гелю та 12% розділювального гелю), а білки фарбували Coomassie Brilliant Blue R-250 (**Jing Lu et al., 2019**).

Клітини збирали центрифугуванням при $8000 \times g$ протягом 10 хв, осад ресуспендували в 10 мл буфера для лізису (50 мМ PBS, рН 8,0 і 0,3 М NaCl) і лізували ультразвуком (400 Вт, ультразвук протягом 2 с, зупинка). протягом 1 с) протягом 15 хв. Неочищений екстракт потім центрифугували при $8000 \times g$ протягом 10 хвилин при 4°C для відділення клітинних уламків. N-кінцевий rMxLOX, позначений гістидином, очищали від розчинної фракції за допомогою афінної смоли Ni²⁺ -NTA. Хроматографічну колонку врівноважували за допомогою буфера для врівноваження (50 мМ PBS, рН 8,0 і 0,3 М NaCl). Промивний буфер (10 мМ імідазолу, 50 мМ PBS, рН 8,0 і 0,3 М NaCl) використовували для видалення всіх домішок шляхом нанесення приблизно 10 об'ємів колонки. rMxLOX елюювали, використовуючи буфер для елюції (200 мМ імідазолу, 50 мМ PBS, рН 8,0 і 0,5 М NaCl) (**Hui Qian et al., 2017**).

Клітини збирали центрифугуванням ($8000 \times g$, 5 хв) і ресуспендували в буфері Tris-HCl (0,05 моль L⁻¹ Tris-HCl, 0,3 моль L⁻¹ NaCl, pH 7,5). Після того як клітини були повністю розбиті за допомогою гомогенізатора високого тиску D-3L (PhD Technology LLC, Міннесота, США), залишки клітин видаляли центрифугуванням (4 °C, $10000 \times g$, 30 хв). Супернатант завантажують на афінну колонку Ni-NTA для очищення. Чистоту та молекулярну масу EnLOX перевіряли електрофорезом у поліакриламідному гелі додецилсульфату натрію (SDS-PAGE) **(Bingjie Zhang et al., 2022)**.

Клітини руйнували за допомогою ультразвуку на льоду протягом 20 хв. Нерозбиті клітини та залишки клітин видаляли центрифугуванням при $13000 \times g$ протягом 10 хвилин при 4 °C, а супернатант фільтрували через фільтр з порами 0,45 мкм. Відфільтрований розчин наносили на іммобілізований картридж для афінної хроматографії з іонами металу (Bio-Rad, Hercules, CA, США), урівноважений 50 мМ фосфатним буфером (pH 8,0), що містить 300 мМ NaCl. Зв'язаний білок у картриджі елюювався лінійним градієнтом 10–250 мМ імідазолу зі швидкістю потоку 1 мл хв⁻¹. Активні фракції збирали та завантажували в знесолюючий картридж Bio-Gel P-6 (Bio-Rad), урівноважений 50 мМ буфером 3-[4-(2-гідроксіетил)-1-піперазиніл]-пропансульфонової кислоти (EPPS) (pH 8,5). Завантажений білок елюювали з використанням того самого буфера при потоці швидкість 1 мл хв⁻¹, а елюований білок використовували як очищений фермент **(Jung-Ung Ani et al., 2018)**.

Для очищення міченого His-tag рекомбінантного Lox1 у нативних умовах використовували Protino Ni-NTA Agarose (Macherey–Nagel). Після центрифугування 50 мл культури клітин клітини ресуспендували в 2 мл буфера для врівноваження/завантаження (50 мМ натрій-фосфатного буфера, pH 7,5) і лізували шляхом обробки гомогенізатором Precellys (PeqLab). Після центрифугування (10 хв при $12000 g$ і 4°C) розчинну фракцію лізису

завантажували на колонку з NiNTA-агарозою (об'єм шару 1 мл), попередньо врівноважену буфером для врівноваження/завантаження. Агарозу Ni-NTA тричі промивали 10 мл буфера для врівноваження/завантаження, після чого слідувала додаткова стадія промивання 15 мл буфера для врівноваження/завантаження, що містить 25 мМ імідазолу. Після останнього етапу промивання 5 мл врівноважувального буфера, що містить 50 мМ імідазолу, рекомбінантний Lox1 елюювали 5 мл врівноважувального буфера, що містить 250 мМ імідазолу. Щоб видалити надлишок імідазолу, зразки білка пропускали через знесолювальну колонку PD-10 (GE Healthcare, Мюнхен, Німеччина) відповідно до інструкції виробника та замінювали на буфер, що містить 50 мМ натрій-фосфатний буфер рН 7,5. Очищений білок зберігали при 20°C (**Sebastian Kelle et al.,2014**).

Клітинну пасту, отриману з 1 л культури експресії, розморожують і ресуспендують у 50–100 мл буфера для лізису: 50 мМ біс(2-гідроксіетил)аміно-трис(гідроксил-метил)метану рН 7,0, що містить 20% (об./об.) гліцерину, 0,3% (мас./об.) 3-[(3-холамідопропіл)диметиламоніо]-1-пропансульфонат, 0,5 М NaCl, 1 мМ 1,4-димеркапто-2,3-бутандіол і 0,2 мМ фенілметилсульфонілфторид. Клітини лізували шляхом додавання 0,1 мг/мл лізоциму та інкубації на льоду протягом 30 хв. Після подальшого руйнування клітин за допомогою руйнівника клітин Sonifier® (B15, Branson) залишки видаляли центрифугуванням при 50 000×g і 4°C протягом 20 хвилин, отримуючи неочищений бактеріальний екстракт без клітин. Екстракт завантажували на попередньо упаковану Protino® Ni-NTA Agarose (Macherey-Nagel) або на колонку His-Trap™ (GE-Healthcare), яка була попередньо врівноважена буфером для лізису за допомогою системи ÄKTAprime (GE Healthcare). Білки, неспецифічно зв'язані з матрицею колонки, елюювали з колонки принаймні 2–3 об'ємами колонки буфера для лізису, що містить 20 мМ імідазолу. FoxLOX елюювали, використовуючи той самий буфер, що містить 0,5

М імідазолу. Чистоту білка оцінювали за допомогою 10% SDS-PAGE (Florian Brodhun et al., 2013).

Таблиця 2.1

Порівняльна характеристика методів виділення і очищення мікробних ліпоксигеназ

Біологічний агент (можна ще додати і локалізація LOX)	Стадії виділення	Особливості хроматографічного очищення	Джерело інформації
<i>Bacillus subtilis</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Осадження клітин сульфатом амонію 2. Іонообмінна хроматографія на DEAE-сефарозі: завантаження на колонку DEAE Sphacel 3. Елюювання зв'язаного білка градієнтом 4. Гель-фільтраційна хроматографія на Sephadex G-100: завантаження на колонку Sephadex G-100. 5. Афінна хроматографія на нікель-NTA агарозі: потім активну фракцію партіями завантажували на 2-мл заряджену нікелем NTA агарозну колонку 6. Очищений LOX гідролізували 6 М HCl при 110 °C протягом 24 годин 	<p>Фракції з активністю LOX збирали і завантажували на колонку Sephadex G-100. Потім активну фракцію партіями завантажували на 2-мл заряджену нікелем NTA агарозну колонку (Pruibest, Шанхай, Китай), яка була попередньо врівноважена буфером для лізису</p>	<p>Chong Zhang et al., 2019</p>

<i>E. coli</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Лізис клітин 2. Центрифугування: 3. Фільтрація 4. Нікель-афінна хроматографія: Зразок завантажували в колонку для хроматографічної афінності з нікелем, попередньо врівноважену буфером 5. Елюція: елюювали 25% буфером 	<p>Подвійне очищення білка, шляхом елюювання 2 буферами : буфер А (20 мМ фосфатний буфер, 20 мМ K₂HPO₄ і KH₂PO₄, рН 7,4), буфер В (20 мМ фосфатний буфер, 20 мМ K₂HPO₄ і KH₂PO₄, 500 мМ імідазол 0</p>	Cuiping Pang et al., 2022
<i>E. coli</i> BL21	<ol style="list-style-type: none"> 1. Лізис клітин 2. Ультразвукова обробка 3. Центрифугування: 4. Фільтрація 5. Нікель-афінна хроматографія 6. Елюція імідазолом 7. Діаліз: Видалення імідазолу 	<p>Колонку NiSepharose 6 Fast Flow від GE Healthcare врівноважували 10 CV буфера для зв'язування (50 мМ NaH₂PO₄, рН 7,0, 300 мМ NaCl і 10 мМ імідазолу). Приблизно 240 мл концентрованого супернатанту культури αPaLOX від індукованого гліцерином культивування наносили на колонку. Колонку промивали буфером для зв'язування та буфером для промивання</p>	Jing Lu et al., 2019
<i>E. coli</i> BL21	<ol style="list-style-type: none"> 1. Лізис клітин ультразвуком 2. Центрифугування 3. Нікель-афінна хроматографія 6. Елюція імідазолом 7. Діаліз: Видалення імідазолу 	<p>N-кінцевий rMxLOX, позначений гістидином, очищали від розчинної фракції за допомогою афінної смоли Ni²⁺ - NTA. Хроматографічну колонку врівноважували за допомогою буфера для врівноваження (50 мМ PBS, рН 8,0 і 0,3 М NaCl).</p>	Hui Qian et al., 2017

Продовження таблиці 2.1

<i>E. coli</i> BL21	<ol style="list-style-type: none"> 1. Лізис клітин гомогенізатором високого тиску 2. Центрифугування 3. Нікель-афінна хроматографія 4. Перевірка чистоти електрофорезом 	<p>Супернатант завантажують на афінну колонку Ni-NTA для очищення.</p>	<p>Bingjie Zhang et al., 2022</p>
<i>E. coli</i> ER2566	<ol style="list-style-type: none"> 1. Лізис клітин 2. Центрифугування: 3. Фільтрація 4. Нікель-афінна хроматографія 5. Елюція 6. Гель-фільтраційна хроматографія: активні фракції збирали та завантажували в знесолюючий картридж Bio-Gel P-6 	<p>Супернатант наносили на іммобілізований картридж для афінної хроматографії з іонами металу (Bio-Rad, Hercules, CA, США), урівноважений 50 мМ фосфатним буфером (pH 8,0), що містить 300 мМ NaCl.</p> <p>Використання гель-фільтраційної хроматографії для видалення імідазолу пімля нікель- афінної хроматографії.</p>	<p>Jung-Ung An et al., 2018</p>
<i>Pichia pastoris</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Лізис клітин гомогенізатором високого тиску 2. Центрифугування 3. Нікель-афінна хроматографія 4. Елюція 	<p>Розчинну фракцію лізису завантажували на колонку з NiNTA-агарозою (об'єм шару 1 мл), попередньо врівноважену буфером для врівноваження/завантаження.</p> <p>Агарозу Ni-NTA тричі промивали 10 мл буфера для врівноваження/завантаження, після чого слідувала додаткова стадія промивання 15 мл буфера для врівноваження/завантаження, що містить 25 мМ імідазолу.</p>	<p>Sebastian Kelle et al., 2014</p>

<i>E. coli</i>	1. Лізис клітин: комбінація лізоциму та ультразвуку 2. Центрифугування 3. Нікель-афінна: екстракт завантажували на попередньо упаковану Protino® Ni-NTA Agarose хроматографія 4. Елюція	Екстракт завантажували на попередньо упаковану Protino® Ni-NTA Agarose (Macherey-Nagel) або на колонку His-Trap™ (GE- Healthcare), яка була попередньо врівноважена буфером для лізису за допомогою системи ÄKTAprime (GE Healthcare).	Florian Brodhun et al., 2013
----------------	--	---	---

2.3. Методики визначення активності ліпоксигеназ

Для визначення активності ліпоксигенази використовують різні методи такі як: спектрофотометричний метод, колориметричний метод, хроматорграфічні методи.

Активність ліпоксигенази визначали спектрофотометрично, спостерігаючи за збільшенням поглинання при 234 нм засноване на перетворенні лінолевої кислоти у відповідний кон'югований гідропероксидієн. Дослідження проводили в 96-лункових планшетах для мікротитрування UV-Star®, що містили 175 мкл цитратно-фосфатного буфера McIlvaine pH 7,0 (0,1 М лимонної кислоти та 0,2 М Na₂HPO₄) і 5 мкл розчину ферменту на лунку. Реакцію ініціювали додаванням 40 мкл свіжоприготованого 2 мМ розчину лінолевої кислоти. Цей розчин субстрату був приготований шляхом змішування 20 мкл (18 мг) лінолевої кислоти з 30 мкл (33 мг) Tween 20, 100 мкл 1 М NaOH і дистильованою водою, спочатку по 2 мл до прояснення розчину, а потім розбавленим води до 32 мл. Були проведені порожні реакції без субстрату та без ферменту паралельний. Поглинання при 234 нм реєстрували кожні 30 с і контролювали протягом 30 хв за допомогою (Chiam Hashem et al., 2020).

Активність LOX визначали спектрофотометрично при 35⁰ С шляхом вимірювання збільшення абсорбції при 234 нм. Субстратну емульсію готували в день аналізу. Розчин субстрату містив 27 мл лінолевої кислоти, 25 мл Tween-20, 1,1 мл 0,5 М NaOH, а потім розбавив до 50 мл фосфатним буфером. Реакційна суміш містила 20 мл розчину субстрату, 10 мл ферменту розчину та 2,97 мл фосфатного буфера. Збільшення на 0,001 за хвилину при 234 нм визначається як 1 U LOX активність (**Jing Lu et al., 2019**).

Субстратну емульсію готували в день проведення аналіз. Розчин субстрату готували змішуванням 27 мкл чистої лінолевої кислоти, 25 мкл Tween-20 і 8 мл деіонізована вода. Розчин освітлювали додаванням 1,1 мл 0,5 М NaOH і розведений до 50 мл фосфатом буфер (рН 6,0). Активність LOX визначали спектрофотометрично при 35 °С шляхом вимірювання збільшення поглинання при 234 нм протягом 3 хв. Реакційна суміш містила 2,97 мл фосфатного буфера, 20 мкл розчину субстрату, 10 мкл розчину ферменту. Одну одиницю активності LOX визначали як збільшення абсорбції на 0,001 за хвилину при 234 нм (**Chong Zhang et al., 2012**).

Активність LOX аналізували в 20 ммоль L⁻¹ Tris-HCl буфері (рН 8,0) при 50 °С шляхом моніторингу збільшення поглинання при 234 нм. Кінцеву концентрацію 1,73 ммоль/л ПНЖК додавали до 3 мл реакційної системи. Одна одиниця активності була визначена як кількість ферменту, необхідного для синтезу 1 ммоль гідропероксиду за хвилину з коефіцієнтом екстинкції 25 000 л моль⁻¹ см⁻¹ (**Bingjie Zhang et al., 2022**).

Специфічну активність *M. xanthus* LOX для субстратів PUFA визначали шляхом вимірювання збільшення поглинання при 234 нм за допомогою спектрофотометра Beckman Coulter DU-700 (Brea, CA, США) після інкубації при 30 °С у 50 mM EPPS (рН 8,5).) буфер, що містить 0,1 mM субстрату та 0,6–3,6 мкг

мл⁻¹ ферменту протягом 3 хв. Для розрахунку активності ферменту використовували лише ту частину кожної реакції, яка показує лінійну кореляцію між концентрацією продукту та часом, а також коефіцієнт екстинкції 25 000 М⁻¹ см⁻¹ для кон'югованих жирних кислот. Одна одиниця активності LOX була визначена як кількість ферменту, необхідного для виробництва 1 мкмоль на хвилину HpFAs при 30 °C і pH 8,5. Питома активність, яку визначали за 1 мл реакційного об'єму, визначали як кількість продукту на кількість білка за одиницю часу реакції. Для визначення кінетичних параметрів реакції проводили при 30 °C у 50 мМ буфері EPPS (pH 8,5), змінюючи кількість ПНЖК від 10 до 900 мкМ протягом 1 хв, а активність ферменту визначали полярографічним методом за допомогою Clark- тип електрода (YSI 5300A, Yellow Springs, OH, USA). Кінетичні параметри, Km (мМ) і kcat (хв⁻¹), були розраховані з використанням концентрації ферменту та графіка Ханеса-Вульфа, отриманого з рівняння Міхаеліса-Ментена (**Jung-Ung Ani et al., 2018**).

Специфічну активність очищеного лінолеату 9S-LOX з *M. xanthus* для субстратів C18 PUFA визначали шляхом вимірювання збільшення поглинання при 234 нм за допомогою спектрофотометра Beckman Coulter DU-700 після інкубації при 35 °C у 50 мМ HEPPS (pH 8,5) буфер, що містить 0,1 мМ субстрату та 3,0-6,0 мкг мл⁻¹ ферменту протягом 2 хв. Використовували лише ту частину кожної реакції, яка демонструє лінійну кореляцію між концентрацією продукту та часом, а активність ферменту розраховували з коефіцієнтом екстинкції 25 000 М⁻¹ см⁻¹ для продуктів кон'югованих жирних кислот. Активність ферменту (U мг⁻¹) визначали як кількість концентрації продукту (мкмоль) на кількість білка (мг) за час реакції (хв). Для визначення кінетичних параметрів реакції проводили при 35 °C у 50 мМ буфері HEPPS (pH 8,5), змінюючи концентрацію C18 ПНЖК від 10 до 900 мкМ протягом 1 хв, а активність ферменту визначали за допомогою вимірювання абсорбції (**Jung-Ung An, et al., 2019**).

Одна одиниця активності LOX визначається як збільшення значення поглинання на 0,001 за 1 хв при 470 нм. Конкретні етапи операції були такими: лінолева кислота (LA) як субстрат була розведена у фосфатному буфері (20 мМ K_2HPO_4 і KH_2PO_4 , рН 7,4) до кінцевої концентрації 0,32 мМ. Якщо не зазначено інше, 20 мкл розведеного розчину LOX інкубували з основним розчином LA протягом 4 хв у присутності 20 мМ фосфатного буфера (рН 7,4) до об'єму 200 мкл. Реакціям дозволяли продовжуватися, додавши 10 мкл 1% розчинного крохмалю і 40 мкл насиченого йодистого калію розчин до змішаного розчину ферменту та субстрату кожні 20 с. Аналіз завершували додаванням 500 мкл 15% розчину оцтової кислоти (Cuiping Pang et al., 2022).

Але найбільш оптимальним є колориметричний метод, так як використовуючи його можна визначити велику кількість зразків у порівнянні з іншими методами. Спектрофотометричний аналіз вимагає багато часу з низькою потужністю, колориметричний аналіз окислення заліза-ксиленоловий оранжевий (FOX) був використаний як альтернативний простий аналіз для вимірювання активності для ферментативної характеристики, що обробляє велику кількість зразків одночасно. Аналіз розпочинали додаванням 20 мл ферментного розчину, що містить відповідну кількість ферменту, що викликає 0,2-0,6 поглинання при 620 нм наприкінці, до 80 мл 50 мМ кожного буфера (фосфатний буфер для рН 7 і боратний буфер для рН 9, якщо не вказано інше), що містить 0,7 мМ субстрату (альфа-ліноленова або лінолевої кислоти), диспергують з 0,02% Tween 20 та інкубують при 25°C протягом 10 хв. Аналіз завершували додаванням 900 мл реагенту FOX, що складається з 25 мМ сірчаної кислоти, 100 мМ ксиленолового оранжевого, 100 мМ сульфату заліза (II), 4 мМ бутильованого гідрокситолуолу (ВНТ) у суміші метанол:вода (9:1 на об'єм). В якості холостого зразка розчин ферменту додавали після додавання реагенту FOX. Жовтий колір підкисленого ксиленолового помаранчевого змінився на синій через опосередковане

гідропероксидом окислення Fe 2+до Fe +3. Абсорбція при 620 нм вимірювали через 1 год після додавання реагенту FOX (Akiko Sugio et al., 2018)

Таблиця 2.2

Методи визначення активності ліпоксигенази

Метод	Довжина хвилі, нм	Одиниця активності	Література
Спектрофотометричний	234	Збільшення на 0,001 за хвилину при 234 нм визначається як 1 Од LOX активність	Chiam Hashem et al., 2020
Спектрофотометричний	234	Збільшення на 0,001 за хвилину при 234 нм визначається як 1 Од LOX активність	Jing Lu et al., 2019
Спектрофотометричний	234	Одну одиницю активності LOX визначали як збільшення абсорбції на 0,001 за хвилину при 234 нм	Chong Zhang et al., 2012
Спектрофотометричний	234	Одна одиниця активності була визначена як кількість ферменту, необхідного для синтезу 1 ммоль гідропероксиду за хвилину з коефіцієнтом екстинкції 25 000 л моль ⁻¹ см ⁻¹	Bingjie Zhang et al., 2022

Закінчення таблиці 2.2

Спектрофотометричний	234	Одна одиниця активності LOX була визначена як кількість ферменту, необхідного для виробництва 1 мкмоль на хвилину гіперпероксиду при 30 °C і pH 8,5	Jung-Ung Ani et al., 2018
Спектрофотометричний	234	Активність ферменту (U мг ⁻¹) визначали як кількість концентрації продукту (мкмоль) на кількість білка (мг) за час реакції (хв)	Jung-Ung An, et al., 2019
Спектрофотометричний	470	Одна одиниця активності LOX визначається як збільшення значення поглинання на 0,001 за 1 хв при 470 нм	Cuiping Pang et al., 2022
Колориметричний	620		Akiko Sugio et al., 2018

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Характеристика цільового продукту

Ліпоксигенази (LOX) – ферменти, які мають вирішальне значення для каталізації окислення ліпідів, таким чином регулюючи широкий спектр клітинної активності (Chem. Inf. Model. 2019).

ЛОКС містяться як у прокариотів (наприклад, бактерій), так і в еукаріотів (рослин, грибів і тварин). ЛОКС беруть участь в утворенні ліпідних медіаторів – сигнальних молекул, що беруть участь у запальних каскадах у тварин, включаючи різноманітні ейкозаноїди (наприклад, лейкотрієни, гідроксиейкозатетраєнову кислоту [HETE] та

15-гідропероксиейкозатетраєнову кислоту [15-HPETE]), (і це лише деякі з них). У рослин вони відіграють певну роль у захисній системі проти шкідників, синтезі оксиліпінів, проростанні та старінні. LOX також присутні в деяких прокариотів, хоча лише деякі з них були біохімічно охарактеризовані. Найпоширенішими субстратами LOX є поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК). Специфічність каталітичної активності LOX (положення сайту оксигенації в поліненасичених жирних кислотах) була цікавим питанням для біологів. Існують LOX, специфічні для більшості доступних окислюваних позицій на лінолевій кислоті (LA) та арахідоновій кислоті (AA) – двох поширених субстратах LOX. Члени родини LOX названі на честь вуглецю PUFA, який вони оксигенують; наприклад, 12LOX оксигенує AA по вуглецю 12 (C12), 15LOX по C15 тощо. Геном людини містить шість функціональних генів арахідонатної LOX (ALOX).

					НУХТ БТЕК 02.01.19 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Піхало В. О.			Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Красінько В.О.					56	1
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Дві з них кодують форми 15LOX, які були ретельно вивчені через їхню участь у фероптозі. та аномальні метаболічні реакції, пов'язані з астмою, ураженнями мозку, нирок та кишечника. ALOX15 кодує 15LO1, який експресується у високих рівнях в еозинофілах, епітеліальних клітинах дихальних шляхів, оброблених інтерлейкіном-4, та моноцитах; LOX15B кодує 15LO2, який високо експресується в різних епітеліальних клітинах (Chem. Inf. Model. 2019).

Члени надродини LOX мають спільне структурне ядро незалежно від їхнього походження – бактеріальне, рослинне, грибкове, безхребетне чи хребетне. Це окремі поліпептидні ланцюги з молекулярною масою ~75–80 кДа у тварин та ~94–104 кДа у рослин та висококонсервативним каталітичним центром. Фігура 1a ілюструє спільне структурне ядро та каталітичний сайт у LOX з *Pseudomonas aeruginosa* (також званий pLoxA), який ми використовуємо як наш орієнтир (Chem. Inf. Model. 2019).

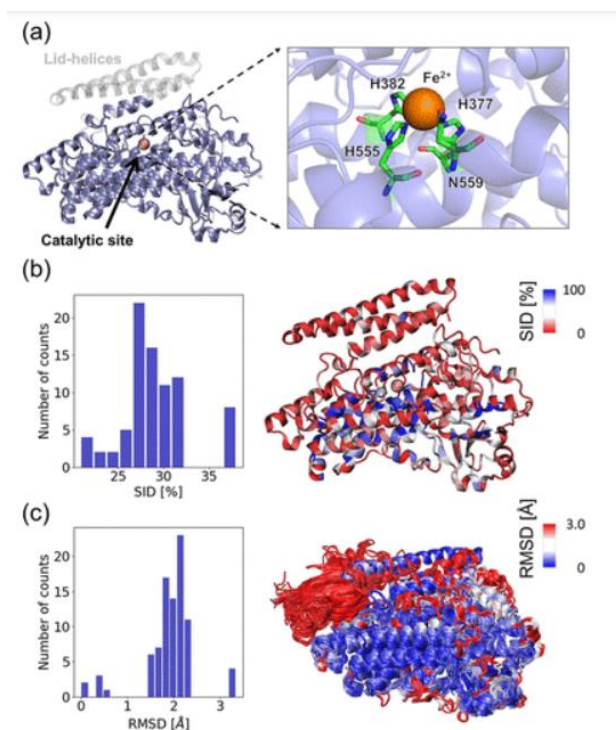


Рис 3.1 Послідовність та структурні властивості членів родини ліпоксигеназ (Chem. Inf. Model. 2019).

3.2 Потреба у цільовому продукті

Пригнічення запалення є важливим напрямом коригуючої фармакотерапії захворювань різної етіології. Сьогодні фармацевтична промисловість виробляє протизапальні лікарські засоби різної хімічної структури та направленості дії. Однак всі вони мають побічні ефекти, від низької біодоступності до невисокої ефективності та руйнівної дії на слизові оболонки кишково-шлункового тракту. Тому дослідження нових активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) та плеiotропних фармакологічних властивостей відомих АФІ з потенційною протизапальною дією є актуальним. Однією з таких речовин є діосмін – флавоноїд, який належить до поліфенольних сполук флавонової структури (5-hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[[[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxochromen-4-one).

За кодом АТС діосмін входить до групи C05CA03 – ангіопротектори. Лікарські засоби цієї групи, що містять діосмін, застосовують для лікування симптомів венозно-лімфатичної недостатності. Комбінація діосміну і гесперидину має венотонізувальні та ангіо-протективні властивості та зменшує взаємодію лейкоцитів та ендотелію, адгезію лейкоцитів у постка-пілярних венах. Це знижує пошкоджувальну дію медіаторів запалення на стінки і стулки клапанів вен. Тому діосмін призначають пацієнтам із хронічними захворюваннями вен для підтримки здоров'я судин. Було доведено, що його застосування опосередковано покращує якість життя. Діосмін також проявляє антиоксидантну активність і поглинає вільні радикали кисню, знижуючи рівні окиснювального стресу, які зазвичай виявляють за допомогою біомаркерів, таких, як попередники простагландинів. Молекулярний механізм дії діосміну не встановлено. Однак у клінічному дослідженні показано, що середній рівень у сироватці крові таких медіаторів запалення, як TNF-альфа, VEGF-C, VEGF-A, IL-

б, був знижений після терапії пацієнтів лікарським засобом на основі діосміну. Загальні тенденції європейської дослідницької практики пов'язані з максимальним із можливо прийнятних переведенням досліджень фармакологічних властивостей АФІ з *in vivo* на *in vitro* (чи *ex vivo*). Тому доцільним є розробка методів дослідження протизапальних властивостей речовин без використання тварин. Одним із таких методів дослідження протизапальних властивостей є вивчення інгібування ензиму 15-ліпоксигенази. Інгібуючі ефекти 15-ліпоксигенази переважно оцінюють за допомогою 15-ліпоксигенази сої (15-sLOX) або 15-ліпоксигенази з ретикулоцитів кролика для аналізу *in vitro*. 15-sLOX зазвичай застосовували як модель людської 15-ліпоксигенази через подібність у структурі та механізмі взаємодії. Вивчення інгібування 15-sLOX діосміном та речовинами подібної хімічної структури може стати ефективним способом оцінки протизапальних властивостей речовин на етапі доклінічних досліджень. Одержані результати можуть бути використані при плануванні фармакологічних досліджень флавоноїдів та на первинних етапах фармацевтичної розробки нових лікарських засобів протизапальної дії (В. І. Бессарабов, Н. П. Здерко, 2023)

3.3 Розрахунок річної потреби

За одне культивування можна отримати ліпоксигеназу з активністю 23 850 Од/мл (Chong Zhang et al., 2019).

Оскільки чіткої публічної статистики про річну кількість доклінічних (*preclinical*) досліджень у відкритих джерелах для України немає і кількість клінічних триалів (які частково відображають активність R&D) коливається сотнями. Тому для розробки різних сценаріїв використання ЛОГ для доклінічних досліджень було залучено аналітичну допомогу GPT-5 (ChatGPT, OpenAI), яким було запропоновано реалістичний діапазон 100–500 доклінічних

проектів/досліджень на рік. Крім того доклінічні дослідження сильно різняться: від невеликих *in vitro* експериментів (кілька мг/дозу) до великих *in vivo* експериментів (більше матеріалу для серії проб).

Тому було запропоновано три різні сценарії розрахунку річної потреби ліпоксигенази для використання її у доклінічних випробуваннях (табл. 3.1):

- Консервативний (500 проектів): $1 \cdot 10^6$ Од/проект — малий *in vitro* проект (малі серії тестів).
- Базовий (300 проектів): $7,37 \cdot 10^8$ Од/проект — середній доклінічний проект (комбінація *in vitro* + *in vivo* із помітними потребами).
- Оптимістичний (100 проектів): $2,210895 \cdot 10^9$ Од/проект — великий GLP-проект (великий обсяг біоматеріалів/препаратів).

Таблиця 3.1

Сценарій	Досліджень/рік (припущення)	Активність на 1 досл. (Од)	Характеристика сценарію
Консервативний	500	$1 \cdot 10^6$ Од/проект	малий проект <i>in vitro</i> малі серії
Базовий	300	$7,37 \cdot 10^8$ Од/проект	середній доклінічний проект (комбінація <i>in vitro</i> + <i>in vivo</i> із помітними потребами).
Оптимістичний	500	$2,210895 \cdot 10^9$ Од/проект	великий GLP-проект (великий обсяг біоматеріалів/препаратів).

Вхідні дані: активність КР = 23 850 Од/мл = 23 850 000 Од/л.

Формула для об'єму (л): $\text{Required_L} = \frac{\text{Total_U}}{\text{AI}}$

де Total_U — загальна річна потреба в одиницях активності (Од).

Консервативний: $N=500$, $U_{\text{per_study}} = 1 \cdot 10^6$ Од \rightarrow $Total_U = 5,00 \cdot 10^8$ Од.

Базовий: $N=300$, $U_{\text{per_study}} = 7,37 \cdot 10^8$ Од \rightarrow $Total_U = 2,211 \cdot 10^{11}$ Од.

Оптимістичний/фокусований: $N=100$, $U_{\text{per_study}} = 2,210895 \cdot 10^9$ Од \rightarrow
 $Total_U = 2,210895 \cdot 10^{11}$ Од.

Консервативний: $Total_U = 5,00 \cdot 10^8$ Од $Required_L = \frac{5,00 \cdot 10^8}{23850000} \approx 20,96$ л \rightarrow
 $0,02096$ м³ $\approx 0,021$ м³/рік

Базовий: $Total_U = 2,211 \cdot 10^{11}$ Од $Required_L = \frac{2,211 \cdot 10^{11}}{23850000} \approx 9\,270,44$ л \rightarrow
 $9,270$ м³/рік

Оптимістичний: $Total_U = 2,210895 \cdot 10^{11}$ Од $Required_L = \frac{2,210895 \cdot 10^{11}}{23850000} \approx 9\,270,00$ л \rightarrow $9,270$ м³/рік.

3.4. Розрахунок потужності виробництва ліпоксигенази

Приймаємо кількість робочих днів 30 (у інші робочі дні року виробництво буде переорієнтовано інших ферментів), тоді кількість продукту на добу складе:

$$V_d = V_{кр} / T_{рд} = 9270 / 30 = 309 \text{ л}$$

Далі визначаємо кількість виробничих циклів на рік:

$$N_{ц} = V_{кр} / ((V_d \times T_{цф}) / 24) = 9270 / ((309 \times 39) / 24) = 19 \text{ циклів,}$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера

Далі розрахуємо кількість культуральної рідини за один цикл, ($V_{крц}$):

$$V_{крц} = K_1 \times V_d \times T_{цф} / 24 = 1,1 \times 309 \times 39 / 24 \approx 547 \text{ л,}$$

Геометричний об'єм ферментера для отримання 547 л культуральної рідини з коефіцієнтом заповнення 0,6 має становити:

$$V_{\Gamma} = V_{\text{крц}}/K_{\text{зап}} = 547/0,6 = 912 \text{ л} \approx 1 \text{ м}^3$$

РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СТАДІЙ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

4.1. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання ліпоксигенази

Вибір раціональних методів виділення і очищення кінцевого продукту для використання на післяферментаційних етапах є досить важливою частиною біотехнологічного процесу, оскільки вартість цих етапів може становити більше 50 % від усіх витрат на виробництво. Фізико-хімічна природа кінцевого продукту, а також місце його локалізації критично впливає на складність виділення і очищення молекули, що буде масштабована у промислове виробництво. (Mnif, & Ghribi, 2016).

Ліпоксигеназа (ЛОГ) є залізовмісною діоксигеназою, яка широко використовується для покращення якості харчових продуктів та виробництва активних лікарських проміжних продуктів і біодизелю. ЛОГ переважно каталізує діоксигенацію поліненасичених жирних кислот з однією або кількома цис, цис-1,4-пентадієновими одиницями для отримання гідропероксижирних кислот, які використовуються в харчовій, хімічній та текстильній промисловості. Наразі більшість прикладних досліджень базуються на ЛОГ, екстрагованій із сої. Однак складні ізоферменти та гетерогенність сировини ускладнюють контроль якості ЛОГ для відповідності промисловим вимогам. Зі швидким розвитком біотехнології було досліджено ендегенну та гетерологічну експресію ЛОГ у мікроорганізмах, у яких має вищу чистоту (без ізозиму) та специфічність, ніж ЛОГ, що продукується з сої.

					НУХТ БТЕК 02.01.19 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Піхало В. О.				Розділ 4. Обґрунтування вибору стадій технологічного процесу	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Красінько В.О.						63	1 63
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Проте деякі проблеми, включаючи недостатній рівень експресії та низьку активність ферментів не дають повноцінно використовувати біотехнологічний спосіб отримання ферменту (Pang C. та ін., 2022).

Escherichia coli є одним із найбільш широко використовуваних мікроорганізмів-господарів для експресії рекомбінантних білків; однак, її слабка здатність до позаклітинної секреції перешкоджає ефективному виробництву рекомбінантних білків у позаклітинне середовище. Для полегшення подальшого промислового виробництва ЛОГ, підвищення ефективності її секреції з *E. coli* використовують методи генної інженерії що полягають у конструюванні високопродуктивних штамів.

Позаклітинне виробництво рекомбінантних білків має кілька переваг порівняно з секрецією в периплазму. Позаклітинне виробництво не вимагає порушення зовнішньої мембрани для відновлення цільових білків, і, отже, воно дозволяє уникнути внутрішньоклітинного протеолізу периплазматичними протеазами та дозволяє безперервне виробництво рекомбінантних білків. На основі цих переваг у *E. coli* було розроблено різні стратегії для позаклітинного виробництва рекомбінантних білків. Для стимулювання позаклітинної секреції рекомбінантних білків з *E. coli* було застосовано ряд методів. До них належать використання біохімічних речовин, фізичних методів (осмотичний шок, заморожування та розморожування), обробка лізоцимом та хлороформний шок. Однак ці методи можна застосовувати лише після збору клітин. *E. coli* зазвичай не секретує білки позаклітинно, за винятком кількох класів білків, таких як токсини та гемолізін. Секретовані білки можуть просочуватися з периплазматичного простору в культуральне середовище, можливо, через підвищену проникність клітинної мембрани протягом тривалого періоду інкубації. Невеликі білки, що секретуються в периплазму, часто вивільняються в культуральне середовище. Загалом, переміщення рекомбінантних білків з

периплазми в культуральне середовище є результатом порушення цілісності зовнішньої мембрани.

Однак під час такого виробництва рекомбінантних білків слід бути обережним, щоб не поставити під загрозу цілісність клітин, що часто призводить до загибелі клітин. Цікаво, що гліцин або Triton X-100, додані до середовища, уповільнили утворення тілець включення в периплазмі та підвищують ефективність позаклітинного виробництва рекомбінантних білків. Було виявлено, що гліцин викликає морфологічні зміни, такі як збільшена сфероїдальна морфологія в *E. coli*, оскільки він включений до пептидоглікану. Додатки гліцину можуть дещо порушити зшивання пептидоглікану та цілісність клітинної мембрани. (Pang C. та ін., 2022).

Порівняно з накопиченням цільового ферменту в клітинах, позаклітинна секреція ефективно спрощує подальше розділення, уникає внутрішньоклітинної протеолітичної деградації та зменшує агрегацію білка. Повідомлялося про дві основні стратегії використання *E. coli* для виробництва позаклітинних білків: контрольований лізис клітин та трансмембранний транспорт, опосередкований сигнальним пептидом. Секреція рекомбінантного білка за допомогою сигнального пептиду є традиційним методом, що використовується для позаклітинного виробництва. Позаклітинне виробництво білка може бути досягнуто шляхом часткового порушення або модифікації зовнішньої мембрани або клітинної стінки для забезпечення проникності за допомогою фізико-хімічних методів (наприклад, ультразвук/Triton X-100) або ферментативної обробки (наприклад, лізоцим) (Бао R.М. та інш, 2016). Втручання в пептидоглікан клітинної стінки та мембранну мережу за допомогою штамової інженерії також може ефективно посилити позаклітинну секрецію білка у *E. coli* (Ehgartner D. та інш., 2017, Yang H. та інш, 2019, Pang C., 2022)

Таким чином біосинтез внутрішньоклітинної ЛОГ характеризується на порядок вищою активністю ферменту порівняно із синтезом назовні клітини, проте потребує додаткових затрат і маніпуляцій із структурними компонентами клітин продуцента для виділення і виробництва у промислових масштабах.

4.1.1. Етапи виділення й очищення ЛОГ

Для виділення й очищення ЛОГ необхідно виконати такі стадії:

1. Гомогенізація;

2. Відокремлення біомаси:

– центрифугування культуральної рідини.

3. Виділення ЛОГ:

– лізис клітин продуцента;

– центрифугування із метою відокремлення осаду залишків клітин;

– нікель-афінна хроматографія з метою очищення ферменту;

– діаліз з метою відокремлення компонентів хроматографії і стабілізації ферменту;

– сублимаційна сушка для видалення зайвої вологи;

– подрібнення та просіювання для отримання товарного вигляду фінішного продукту.

**Після етапу центрифугування для подальшого виділення та очищення ліпоксигенази застосовували ультразвуковий дезінтегратор. Використання саме цього методу було обґрунтованим, оскільки ультразвукова обробка забезпечує ефективну та контрольовану гомогенізацію біологічного матеріалу без внесення додаткових реагентів чи механічного забруднення. За даними*

науково-дослідної літератури, ультразвукова дезінтеграція є рекомендованим і часто єдиним достатньо делікатним способом руйнування клітин при роботі з ферментами, чутливими до перегрівання та механічного зсуву, до яких належить і ліпоксигеназа. Завдяки цьому метод дозволяє отримати стабільний та активний фермент для подальших стадій очищення.

4.1.2. Відокремлення біомаси

Так як фермент локалізовано у клітинах продуцента, то на першому етапі необхідно відділити клітини із культуральної рідини, що містить залишки поживного середовища та продукти життєдіяльності продуцента. Для цього можна використати такі методи як центрифугування, седиментація, а також різні типи фільтрування.

Седиментація (осадження) – це процес розшарування дисперсних систем під дією сили тяжіння й відділення дисперсної фази у вигляді осаду. Оскільки швидкість осадження клітин мікроорганізмів з культуральної рідини становить лише 10^{-6} – 10^{-7} м/с, то для прискорення процесу осадження застосовують коагулянти і флокулянти. Седиментацію використовують у випадках коли:

- діаметр часток більше 3 мкм;
- необхідно отримати стабільний продукт, в умовах коли фактор часу не значення;
- якщо інші методи розділення є значно дорожчими;
- необхідне розділення часток на фракції за розміром або щільністю (в залежності від різниці у швидкості осадження);
- суспензію ділять на дві фракції – осад і надосадову рідину, які в подальшому будуть використовувати на різному обладнанні. (Кравченко О. О., Савчук О. М., Остапченко Л. І. 2019)

Фільтрування – це процес розділення твердої та рідкої фаз суспензії під час її пропускання через пористу перегородку, з метою одержання твердої або рідкої фази (якщо якась із них буде направлена на утилізацію у якості відходів) або одночасне одержання обох фаз. Протягом фільтрації культуральної рідини, що в середньому протікає із швидкістю 50 л/м² отримують осад драглисто-пластівчастої або дрібнозернистої консистенції (Карлаш Ю.В., Красінько В.О., 2022).

Для фільтрування існують різноманітні фільтруючі системи (карусельні вакуум-фільтри, фільтри-преси, барабанні, стрічкові, тарілчасті, мембранні фільтри) що працюють на принципі затримці біомаси на пористій фільтруючій перегородці. Проте швидке налипання клітин біомаси на фільтрувальному матеріалі, є суттєвим недоліком, що зменшує швидкість фільтрування. Для фільтрувальних систем безперервної дії передбачено автоматичне очищення фільтрувального матеріалу від клітин за допомогою спеціальних ножів, стиснутого повітря або шляхом покриття фільтрувального матеріалу різними захисними плівками. Фільтрувальний матеріал, такий як мембранні (зокрема тефлонові) фільтри використовують для фільтрування розведених клітинних суспензій. Проте пори таких фільтрувальних матеріалів досить швидко закупорюються клітинами, білками та іншими частками. Щоб запобігти таким ускладненням у роботі, мембранні фільтри покривають гідрофільним шаром, що перешкоджає контакту білків з поверхнею фільтра. (Кравченко О. О., Савчук О. М., Остапченко Л. І. 2019)

Центрифугування процес, що дозволяє розділити неоднорідні системи під дією відцентрових сил. Для проведення цього процесу використовують центрифуги різних конструкцій, наприклад центрифуги, що оснащені тарілчастим барабаном і забезпечують високий фактор розділення, називаються сепараторами (дозволяють сконцентрувати осад до вологості 60-90 %).

Центрифугування дає можливість отримувати біомасу із культуральної рідини та відділяти різноманітні продукти мікробного синтезу (антибіотики, вітаміни, ферменти), які заздалегідь були переведені у тверду фазу. Недоліками центрифугування є висока вартість та енергоємність, вплив на живі клітини відцентрових сил, нагрівання, а також труднощі із герметизацією та забезпеченням асептики процесу. Незважаючи на вище зазначені недоліки, центрифугування є одним із найбільш продуктивних методів виділення, що дозволяє отримати високо концентрований кінцевий продукт. Центрифугування є дорожчим, ніж наприклад фільтрування і застосовується, коли суспензія фільтрується надто довго або треба зібрати максимально можливу кількість кінцевого продукту. (Кравченко О. О., Савчук О. М., Остапченко Л. І. 2019, Стасевич М.В., 2018.)

4.1.3. Лізис клітин

Руйнування клітин може бути здійснено за допомогою ферментативних, хімічних та фізичних методів. У промислових масштабах використовуються такі методи: ультразвук; лопаткові або вібраційні дезінтегратори; струшування зі скляними намистинами; продавлюванням через вузькі отвори під високим тиском; роздавлювання замороженої маси; за допомогою декомпресії; за допомогою осмотичного шоку; багаторазове заморожування і танення. Фізичні методи відрізняються більшою економічністю порівняно з іншими методами, однак обробка може негативно впливати на якість кінцевого продукту. Застосування хімічних і ферментативних методів призводить до м'якого вибіркового руйнування клітинної стінки – бактеріальні клітини руйнуються лізоцимом за наявності ЕДТА, а клітинні стінки дріжджів – зимоліазою або ферментами грибів / актиноміцетів. Можна використовувати обробку толуолом / бутанолом, а також під дією деяких антибіотиків: поліміксину, новобіопіну, ністатину. Аналогічний ефект забезпечує обробка клітин деякими поверхнево-

активними речовинами. (Кравченко О. О., Савчук О. М., Остапченко Л. І. 2019, Стасевич М.В., 2018.)

Після закінчення процедури лізису, дуже важливо видалити залишки клітинних органел, тому знову використовують один із способів відокремлення – центрифугування або фільтрацію. Варто зазначити, що під час повторної процедури використовують більш швидкісні центрифуги та фільтри з меншим діаметром пор (мембранні фільтри) (Кравченко О. О., Савчук О. М., Остапченко Л. І. 2019, Стасевич М.В., 2018.)

4.1.4. Нікель-афінна (біо-специфічна) хроматографія

Хроматографічне розділення складних макромолекул, що базується на здатності хроматографічного сорбенту, при пропусканні розчину, селективно зв'язувати потрібну макромолекулу і утримувати її у колонці. Після промивання колонки десорбуючою рідиною, потрібна макромолекула елююється.

Це є основою афінної хроматографії, яка потребує не лише наявності певних поверхневих властивостей хроматографічного сорбенту, але і специфічних умов, в яких проявляються ці властивості. Кожне середовище (адсорбент) розроблене для конкретної молекули або класу молекул, що потребують очищення, оскільки не існує універсальних афінних (споріднених) середовищ. Але мають бути створені такі умови адсорбції, при яких під час елюції, незважаючи на конкуренцію з молекулами ліганду або зміни у складі рухомої фази для покращення властивостей ліганду або розчиненої речовини, не буде порушено взаємодію адсорбент-макромолекула. Спорідненість між адсорбуючою матрицею та розчиненими речовинами вперше була помічена при вибірковій адсорбції α -амілази на нерозчинному крохмалі. Завдяки використанню афінної хроматографії можна досягти дуже високих ступенів очищення (близько 1000-кратного, з високим виходом цільової молекули). Крім того, дослідження

властивості «структура – функція» продемонстрували, що можна значно зменшити розмір лігандів білків, щоб забезпечити одержання хімічно стійкіших лігандів.(Кравченко О. О., Савчук О. М., Остапченко Л. І. 2019).

Афінні сорбенти складаються із макропористої хроматографічної матриці, до якої "пришивають" або приєднують специфічні ліганди. Ліганди можна поділити на 2 групи – групоспецифічні та моноспецифічні. До групоспецифічних лігандів належать: 1) білки А та G для очищення імуноглобулінів, 2) лектини – для очищення глікопротеїнів, 3) барвники – для очищення НАД- і НАДФ-залежних ферментів, 4) полінуклеотиди – для очищення олігонуклеотидів, 5) хелатуючі групи (наприклад імінооцтова кислота, що використовуються для сорбції іонів металів, які зв'язують амінокислоти, наприклад гістидин, цистеїн. Такий спосіб є афінною хроматографією з іммобілізованим металом.

До моноспецифічних лігандів, тобто тих, що зв'язуються з дуже малою кількістю розчинених речовин, наприклад лізином, можна віднести плазміноген, і біотин, що зв'язує авідин. Такий зв'язок дуже міцний і вимагає досить жорстких умов для елюції. Антитіла є дуже популярними лігандами, оскільки володіють високою специфічністю. Такий тип афінного сорбенту називають імуносорбентом (Кравченко О. О., Савчук О. М., Остапченко Л. І. 2019)

Базова матриця для афінного сорбенту повинна володіти наступними властивостями:

- забезпечити належні точки приєднання;
- мати великий розмір пор, щоб забезпечити місця для великих лігандів і швидкий доступ до них;
- володіти високою пропускною здатністю;
- бути хімічно інертною.

В порівнянні із іншими адсорбційними процесами, адсорбція розчинених речовин з великими молекулами повільніша в афінній хроматографії, тому що ця взаємодія потребує правильної орієнтації розчиненої речовини. Саме через це, для адсорбції використовують низькі швидкості потоку.

Щоб виконати десорбцію у афінній хроматографії, збільшують константи дисоціації за рахунок зниження рН, збільшення іонної сили або шляхом конкурентної елюції. Десорбція у афінній хроматографії з іммобілізованим металом (нікель-залежна) включає зниження рН, збільшення іонної сили або видалення іона металу шляхом додавання етилендіамінтетраоцтової кислоти або іншої комплексоутворюючої речовини. Теоретична зв'язувальна здатність для білка з молекулярною масою 60000 Да становить близько 80 мг/мл на 4 %-му агарозному афінному сорбенті (Кравченко О. О., Савчук О. М., Остапченко Л. І. 2019).

4.1.5.Сублімація

Вибір методів сушіння залежить від фізико-хімічних та біологічних особливостей продукту, що зневоднюється, а саме у в'язкості розчину або ступенем збереження життєздатності клітин. Зневоднення в атмосфері газоподібних нагрівальних агентів (пара, повітря, вуглекислий газ), які з високою швидкістю подаються в сушильний апарат знизу, при цьому продукт зневоднення перебуває у газовому потоці. Перевага полягає в організації безперервного процесу, а також можливості регулювати інтенсивність масотепло-обміну (Карлаш Ю.В., Красінько В.О., 2022).

Для зневоднення мікробних суспензій застосовуються барабанні сушарки, у яких барабани, що підігріваються, обертаються в ємностях із мікробною суспензією. У вакуумних сушильних шафах за знижених значень тиску і температури, сушать особливо лабільні речовини. Також використовують

розпилювальні сушильні апарати, в яких шляхом пропускання крізь форсунки (або диски, які обертаються) розчини / суспензії (які подаються з нагрітим до 110–150 °С газом) перетворюються в аерозоль (Кравченко О. О., Савчук О. М., Остапченко Л. І. 2019).

Найпоширенішими для висушування лабільних білкових препаратів є ліофільні сушарки. Збереження біологічного матеріалу без пошкодження через заморожування води з подальшим видаленням льоду сублімацією є основним принципом цього способу висушування. Вода видаляються у вигляді пари у вакуумній камері, залишаючи суху пористу масу, яку можна повторно розчинити у воді завдяки структурній стійкості поверхні. Стійкість запобігає руйнуванню твердої матриці і у результаті утворюється пориста, непресована структура, що полегшує швидку і практично повну повторну гідратацію після додавання води (Кравченко О. О., Савчук О. М., Остапченко Л. І. 2019, (Карлаш Ю.В., Красінько В.О., 2022).

Процес сушіння сублімацією є досить дорогим процесом через повільну швидкість висушування та застосування вакууму, оскільки потрібно створити дуже низький тиск або глибокий вакуум (температура -20 °С або нижче, абсолютний тиск 0,3 мм ртутного стовпа).

Метод ліофілізації складається із таких стадій:

1) Заморожування. Продукт або розчин охолоджують до температури, за якої весь матеріал перебуває в замороженому стані. В такому стані заморожена вода перебуває у вигляді льоду (65–90 %) і незамороженої води (10–35 %), яка перебуває в адсорбованому (зв'язаному) стані.

2) Первинне висушування. Температуру замороженого шару найчастіше знижують до -20 °С і за тиску 0,3 мм ртутного стовпа.

3) Вторинне висушування. На цій стадії висушування видаляють воду, яка не була заморожено (адсорбована чи зв'язана вода), за допомогою нагріванням продукту у вакуумі методами провідності, конвекції та/чи радіації (Кравченко О. О., Савчук О. М., Остапченко Л. І. 2019).

Процес ведуть у таких температурних умовах:

- нижче 0 °С для вакцин;
- 10 - 35 °С для чутливих до нагрівання продуктів;
- 50 °С або більше для менш чутливих до тепла продуктів.

4.2. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях.

Післяферментаційні стадії складаються із таких операцій:

1. Гомогенізація;
2. Відокремлення біомаси:
 - центрифугування культуральної рідини.
3. Виділення ЛОГ:
 - лізис клітин продуцента;
 - центрифугування із метою відокремлення осаду залишків клітин;
 - нікель-афінна хроматографія з метою очищення ферменту;
 - діаліз з метою відокремлення компонентів хроматографії і стабілізації ферменту;
 - сублимаційна сушка для видалення зайвої вологи;

– подрібнення та просіювання для отримання товарного вигляду фінішного продукту.

Вихідні дані:

1. V культуральної рідини за 1 ферментацію – 547 л;
2. концентрація цільового продукту у КР – активність ЛОГ – 23 850 Од/мл
3. концентрація біомаси у КР – 0,5 г/л

втрати на стадіях виділення цільового продукту складають 27 %:

Розподіл втрат цільових продуктів по стадіях та підбір необхідного обладнання наведено в таблиці 4.1:

Таблиця 4.1

Розподіл втрат по стадіях та підбір необхідного обладнання

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати ЛОГ (27%)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
ДР. 1 Приготування буферу для лізису клітин						
1	ДР 1.1. Приготування суміші калій-фосфатного буферу, гліцеролу, Triton X-100 та імідазолу	Суміш органічних речовин 50 мМ калій-фосфатного буферу (6,80 г/л), 300 мл/л гліцеролу, 3 мл/л Triton X-100 та 5 мМ імідазолу (0,34 г/л)	(калій-фосфатного буферу 17,68 г, гліцеролу 780 мл, Triton X-100 7,8 мл, імідазолу 0,88 г)	–	806,36 г	Ємність об'ємом 1 л перекачується самоплином до збірника на 5 л
ДР. 2 Приготування розчину імідазолу для елюції						
2	ДР 2.1. Приготування 100-150 мМ розчину імідазолу для елюції білку	Розчин імідазолу 100-150 мМ (6,808-10,21 г/л)	10,21 г/л	–	29,68 г	Колба об'ємом 200 мл Перекачується самоплином до рідинного RP-HPLC хроматографу Agilent 1260

Продовження таблиці 4.1

ДР. 3 Приготування розчину калій-фосфатного буферу для діалізу						
3	ДР 3.1. Приготування розчину 50 мМ калій-фосфатного буферу для діалізу	50 мМ калій-фосфатного буферу (6,80 г/л)	6,80 г/л	–	19,99 г	Колба об'ємом 100 мл Перекачується самоплином до установки для проведення діалізу
ТП 2. Зберігання культуральної рідини						
4	ТП 2.1 Зберігання культуральної рідини	Культуральна рідина (КР) (кількість ліпооксигенази – 23 850 Од/мл)	547 л	–	547 л	Збірник КР об'ємом 630 л
ТП 3. Відокремлення біомаси						

Продовження таблиці 4.1

5	ТП 4.1 Центрифугування 1	Біомаса	273,5 г (547x0,5) з врахування м 90 % вологості 2735 г	5 % 136,75 г	2,598 кг	Центрифуга , 8000 об/хв, 15 хв. Передається до збірника- змішувача 5 л
		Супернатант	544,402 л (547 л – 2,598 кг)	–	544,40 2 л	Перекачується відцентровим насосом продуктивністю 10 л/хв до реактора об'ємом 630 л. Супернатант – на утилізацію
ТП 4. Руйнування клітин біомаси						
6	ТП 5.1 Лізис клітин у <u>гомогенізаторі</u> <u>високого тиску</u> за допомогою буферу	Біомаса	2,598 кг	–	–	Збірник-змішувач 5 л із перемішувачим пристроєм
		Буферний розчин	0,806 кг	–	–	
		Лізат клітин	–	–	3,404 кг	Перекачується відцентровим насосом продуктивністю 50 л/хв до збірника об'ємом 5 л

ТП 5. Відокремлення клітинних компонентів						
7	ТП 6.1 Центрифугування 2	Лізат клітин	3,404 кг	5 % (0,170 кг)	3,23 кг	Центрифуга, 12 000 об/хв, 15 хв, Фрагменти біомаси передаються на утилізацію
		Супернатант із ЛОГ	–	–	3,23 кг	Перекачується самоплином до збірника об'ємом 5 л
ТП 6. Зберігання перед очищенням						
8	ТП 7.1 Зберігання розчину у проміжному збірнику	Супернатант із ЛОГ	3,23	–	3,23 кг	Збірник об'ємом 5 л
ТП 7. Очищення						

Продовження таблиці 4.1

9	ТП 8.1 Нікель-афінна хроматографія	Супернатант із ЛОГ	3,23 кг	–	–	Збірник об'ємом 5 л
		Імідазол	29,68 г	–	–	
		Розчин ЛОГ	–	10 % (0,326 кг)	2,93 кг	Рідинний RP-HPLC хроматограф Agilent 1260, колонка для очищення неочищеного білка з гістидином HisTrap™ FF
10	ТП 9. Діаліз	Розчин ЛОГ	2,94 кг	–	–	Збірник об'ємом 5 л із перемішувачем
		Калій-фосфатний буфер	19,99 г	–	–	
		Стабілізована ЛОГ	–	–	3,14 кг	Установка для проведення діалізу SpectraFlo® Mobile System
11	ТП 10. Сублімація	Стабілізована ЛОГ	3,14 кг	–	–	Збірник об'ємом 5 л
		Висушені кристали ЛОГ	–	5 % (0,157)	2,98 кг	

Закінчення таблиці 4.1

12	ТП 11. Подрібнення	Висушені кристали ЛОГ	2,98 кг	–	–	Збірник об'ємом 5 л
		Подрібнені кристали ЛОГ	2,98 кг	1 % (0,298 кг)	2,68 кг	Молоткова дробарка із калібром 2,0 мм Ємність об'ємом 3 л
13	ТП 12. Просіювання	Подрібнені кристали ЛОГ	2,68 кг	–	–	Ємність об'ємом 3 л
		Відкалібровані за розміром кристали ЛОГ	–	1 %(0,268 кг)	2,41 кг	Вібраційне сито із діаметром сита 2,0 мм Ємність об'ємом 3 л
ПМВ 13. Пакування. Маркування. Відвантаження.						
14	ПМВ 13.1. Поступання сировини на сортувальні апарати ПМВ 13.2. Пакування у групову тару	Подрібнені кристали ЛОГ	2,41 кг	–	–	–
		Кристали ЛОГ упаковані у первинну упаковку (пластикові флакони)	–	–	2,41 кг	Автоматичне наповнення тари за асептичних умов

4.3. Специфікація обладнання.

Загальний перелік обладнання, що буде використовуватися для виробництва ліпооксигенази (ЛОГ) наведено у табл. 4.2.

Таблиця 4.2

Специфікація обладнання. Виробництво ЛОГ

Позиція	Найменування позиції	Кількість	Характеристика обладнання
1	2	3	4
33-1 33-7 33-10	Збірник-змішувач	3	Збірник-змішувач об'єм: 630 л. об'єм сорочки: 140 л, температура у середині і сорочці: 0-95 °С, потужність: 380 кВт, Матеріал: AISI 312. Габаритні розміри: 1470x1120x1780 мм, Маса: 860,0 кг
https://promvit.com.ua/reaktor-630-l-s-vstroennym-gomogenizatorom/			
33-14	Збірник-змішувач	1	Збірник-змішувач РП-5, об'єм: 5 л мішалка від 0 до 60 об/хв. Матеріал: AISI 312, потужність: 1635 Вт Габаритні розміри: 1180x620x410 мм, Маса: 65,0 кг
https://promvit.com.ua/laboratornyj-reaktor-rp-5-dlya-mlf-kremy-mazi-geli-5-l/			
Ц-3	Центрифуга	1	Центрифуга DL-8MS, максимальна швидкість: 8 000 об/хв, продуктивність: 6 x 2400 мл, температурний режим: -20..+40 °С, розміри: 900×1000×1300 мм, вага: 320 кг

Продовження таблиці 4.2

https://ua.sumerscience.com/laboratory-equipment/centrifuge/dl-8ms-large-capacity-centrifuge-8000rpm.html			
Ц-9	Центрифуга	1	Центрифуга GL-22MS, максимальна швидкість: 22 000 об/хв, продуктивність: 6 x 600 мл, температурний режим: -20..+40 °С, розміри: 710×840×1200 мм, вага: 260 кг
https://ua.sumerscience.com/laboratory-equipment/centrifuge/gl-22ms-high-speed-refrigerated-centrifuge.html			
НВ-2 НВ-4 НВ-6 НВ-8 НВ-11 НВ-13	Насос-відцентровий	6	Насос-відцентровий NPO JS80 Hmax, продуктивністю 50 л/хв, потужність 800 Вт.
https://epicentrk.ua/ua/shop/mplc-vidcentrovij-nasos-npo-js80-hmax-45-m-qmax-50-l-hv-800-vt-1f01a911-72ce-66ce-9344-8dafadf9723e.html			
ХР-12	Хроматограф	1	Рідинний хроматограф 300DAC Purification HPLC Нагнітальний насос продуктивністю 5 л/хв, 10 МПА, УФ-детектор з проточною коміркою з оптичним волокном, 190-400 нм,
https://www.gshplc.com/300dac_purification_hplc.html			

Закінчення таблиці 4.2

АД-15	Апарат діалізу	1	Апарат діалізу SpectraFlo® Mobile System Об'єм: 5 л
https://www.repligen.com/products/dialysis/spectraflo-dynamic-dialysis-systems			
ДР-18	Дробарка	1	Молоткова дробарка Кількість молотків: 84 шт, діаметр комірки сита 0,5-12 мм, вага:450 кг
https://bioekoprom.com.ua/ua/katalog/izmelchiteli/izmelchiteli_zerna/drobilka_molotkovaya_na_gnetatel'naya_-gnom-_37kvt___4500kgchas/			
ПР-19	Просіювач	1	Вібраційне сито VEVOR 40 Потужність 45 Вт, швидкість двигуна: 1150 об./хв, розміри: 350 x 320 x 360 мм.
https://prom.ua/ua/p2439670447-elektricheskoe-vibratsionnoe-sito.html			

РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ТП 1. Зберігання культуральної рідини

Культуральну рідину отриману зі стадії ферментації подають у збірник змішувач (ЗЗ-1). Температура КР підтримується в апараті на рівня 10°C до подальших стадій. Після чого відцентровим насосом подається до центрифуги (Ц-3)

ТП 2. Центрифугування 1

Після етапу зберігання культуральної рідини здійснюється її перекачування, за допомогою відцентрового насосу (НВ-2) до промислової центрифуги (Ц-3). Центрифугування відбувається упродовж 15 хвилин, при частоті обертання 8000 об/хв. Фугат після центрифугування завантажується до гомогенізатора (ГО-5), де відбувається сам процес.

ТП 3. Гомогенізація

Після етапу центрифугування осад подають на установку для гомогенізації (ГО-5). Тривалість процесу становить приблизно 25хв (або згідно корегувань технолога на підприємстві). Після закінчення даного процесу гомогенізований розчин, за допомогою відцентрового насосу (НВ-6) подають на етап центрифугування 2.

					НУХТ БТЕК 02.01.19 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Піхало В. О.			Розділ 5. Опис технологічної схеми	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Красінько В.О.					85	1
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

ТП 4. Лізис клітин

Далі клітини ресуспендували у лізисному буфері, який складався з 50 мМ калій-фосфатного буферу (рН 6,0), 300 мМ NaCl, 10% гліцеролу, 3 мМ β -меркаптоетанолу, 1% Triton X-100 та 5 мМ імідазолу. Тривалість процесу близько 15 хв. Після чого розчин подають, за допомогою відцентрового насосу (НВ-8), подають на другу центрифугу (Ц-9).

ТП 5. Центрифугування 2

Отриману суспензію центрифугують, щоб відокремити клітинні уламки від розчинної фракції білка. Центрифугування відбувається упродовж 15 хвилин, при частоті обертання 12000 об/хв. Після чого розчин насосом завантажують до проміжного збірника зберігання (ЗЗ-10). Після чого розчин, за допомогою насосу відцентрового (НВ-11), подають на етап нікель-афінної хроматографії (ХР-12).

ТП 6. Зберігання розчину у проміжному збірнику

Після завершення підготовки, до наступної технологічної операції, готовий розчин відцентровим насосом (НВ-11) подають на етап нікель-афінної хроматографії (ХР-12).

ТП 7. Нікель-афінна хроматографія

Супернатант, що містить рекомбінантну ліпоксигеназу, піддають афінній хроматографії на Ni-NTA агарозі, попередньо рівноваженій лізисним буфером. Елюцію цільового білка проводять за допомогою градієнта імідазолу в межах 100–150 мМ. Після чого розчин, за допомогою відцентрового насосу (НВ-13), подають на етап діалізу.

ТП 8. Діаліз

Фракції, що містили активний фермент, об'єднували та піддавали діалізу на апараті для діалізу (АД-15) проти 50 мМ калій-фосфатного буферу (рН 6,0) для видалення імідазолу та стабілізації білка. Після чого готовий розчин розливають по кюветам (К-16) для подальшого етапу сублімації.

ТП 9. Сублімація

Після діалізу готовий розчин розливають по кюветам та завантажують у сублімаційну сушарку (СС-17). Далі починається процес заморожування. Для цього у змієвиковий випарник подають фреон, завдяки чому температура всередині сушарки знижується до $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Охолодження проводять поступово, щоб забезпечити рівномірне проморожування всього шару продукту, уникаючи утворення великих кристалів льоду, які можуть пошкодити структуру продукту. Загальна тривалість цієї стадії становить 16–18 годин. Оптимальною вважається швидкість заморожування близько $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ за хвилину, адже саме такий режим дозволяє зберегти активність біологічних компонентів і забезпечити подальшу ефективність сублімаційного сушіння.

Після того як продукт досягне необхідного рівня заморожування, розпочинається етап сублімації. Температуру в камері поступово підвищують до $+47\text{ }^{\circ}\text{C}$. Цей процес триває близько 72 годин і відбувається за умов глибокого вакууму — тиск у камері не перевищує 0,016 МПа. Нагрівання проводять дуже обережно, зі швидкістю приблизно $1\text{--}3\text{ }^{\circ}\text{C}$ за годину. Такий контрольований режим дає змогу воді переходити з твердого стану безпосередньо у газоподібний (сублімація), не переходячи у рідку фазу. Це критично важливо для того, щоб уникнути втрат активних речовин і запобігти руйнуванню структури висушеної біомаси.

На заключному етапі висушену масу спрямовують на етап подрібнення до дробарки (ДР-18), що полегшує її подальше використання у технологічних процесах або підготовку до фасування.

ТП 10. Подрібнення

Далі, готовий сублімат, подають на стадію подрібнення, на молотковій дробарці (ДР-18), розмір частинок має становити приблизно 2 мм. Після подрібнення препарат подають на стадію просіювання.

ТП 11. Просіювання

Подрібнену сировину, просіюють на просіювачі (вібраційному ситі) (ПР-19), діаметр пор 2 мм. Просів подають на стадію *ПМВ 12.1*. Відсів подається на стадію подрібнення, для досягнення відповідного діаметру частинок.

ПМВ 12. Пакування. Маркування. Відвантаження.

ПМВ 12.1. Поступання сировини на сортувальні апарати

На автоматичну лінію подаються флакони для фасування препарату (ФАС-20), та повної їх герметизації. Після закінчення процесу здійснюють візуальний контроль. Після чого готову продукцію подають на етап пакування у групову тару.

ПМВ 12.2. Пакування у групову тару

Готові промаркеровані пакети, пакують у групову тару зі складу, для подальшого зберігання. Та здійснюють відповідний тип контролю перед їх реалізацією

ЗВ 13. Знешкодження відходів

ЗВ 13.1. Знешкодження рідких відходів

Рідкі відходи від *ТП7 та ТП8*, а також вода після миття обладнання, зливаються у загальну каналізаційну систему до подальшої очистки.

ЗВ 13.2. Знешкодження твердих відходів

Тверді відходи, а саме браковане пакування від *ПМВ12.1*, а також паперові відходи передаються для подальшої переробки, на звалище

РОЗДІЛ 6. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Виділені контрольні точки виробництва зазначені у табл. 6.1.

Таблиця 6.1

6.1. Карта постадійного контролю

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
Кт 1 Зберігання культуральної рідини	Культуральна рідина Температура	Термометр	Температура контролюються і підтримуються автоматично весь час	T=10°C
Кт 2 Центрифугування культуральної рідини	Осад Час, частота обертання	Годинник, тахометр	Час та швидкість обертання контролюються під час процесу центрифугування	t = 15 хв, n = 8000 об/хв
Кт 3 Лізис клітин	Осаджені клітини Час	Годинник	Контролюється час під час лізису	t = 15 хв

НУХТ БТЕК 02.01.19 КР ПЗ				
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Піхало В. О.		
Перевір.		Красінько В.О.		
Консультант				
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		
Розділ 6. Контроль виробництва				
		Літ.	Арк.	Акрушів
		89	1	1
Кафедра БТМ				

Продовження таблиці 6.1

Кт 4 Центрифугування 2	Осад Час, частота обертання	Годинник, тахометр	Час та швидкість обертання контролюються під час процесу центрифугування	t = 15 хв, n = 12000 об/хв
Кт 5 Зберігання розчину у проміжному збірнику	Час	Годинник	Контролюється час	t = 15 хв
Кт 6 Нікель-афінна хроматографія	Концентрація іммідазолу, тиск	Манометр	-	100-150мм
Кт Кх 7 Діаліз	Концентрація калій-фосфатного буфера та його рН, тиск	Датчик рН, манометр	Контролюється концентрація буфера та його рН	50мм, рН 6,0
Кт 8 Сублімація	Температура, тиск	Манометр, термометр	Температура та тиск контролюється під час процесу сублімації	T=-45°C, P = 26 Па, T= 30 °C
Кт 9 Подрібнення	Сублімат Розмір частинок	-	-	2 мм

Закінчення таблиці 6.1

Кт 10 Просіювання	Подрібнена сировина Розмір частинок	-	-	2 мм
Кт 11 Пакування Маркування Відвантаження	Ліпоксигеназа Відсутність механічних пошкоджень і герметичність фальконів	Візуальний контроль	Контролюється відсутність механічних пошкоджень і герметичність фальконів	Відсутність механічних пошкоджень, точність

6.2 Визначення активності ліпоксигенази

Активність ліпоксигенази визначали спектрофотометрично, спостерігаючи за збільшенням поглинання при 234 нм засноване на перетворенні лінолевої кислоти у відповідний кон'югований гідропероксиден.

Дослідження проводили в 96-лункових планшетах для мікротитрування UV-Star®, що містили 175 мкл цитратно-фосфатного буфера McIlvaine pH 7,0 (0,1 М лимонної кислоти та 0,2 М Na₂HPO₄) і 5 мкл розчину ферменту на лунку. Реакцію ініціювали додаванням 40 мкл свіжоприготованого 2 мМ розчину лінолевої кислоти. Цей розчин субстрату був приготований шляхом змішування 20 мкл (18 мг) лінолевої кислоти з 30 мкл (33 мг) Tween 20, 100 мкл 1 М NaOH і дистильованою водою, спочатку по 2 мл до прояснення розчину, а потім розбавленим води до 32 мл. Були проведені порожні реакції без субстрату та без ферменту паралельно. Поглинання при 234 нм

реєстрували кожні 30 с і контролювали протягом 30 хв. Збільшення на 0,001 за хвилину при 234 нм визначається як 1 U LOX активність [1].

6.3 Визначення чистоти ліпоксигенази

Метод SDS-PAGE (натрій-додецилсульфат поліакриламідний гель-електрофорез) — це стандартний аналітичний метод для перевірки чистоти білків.

Сутність методу полягає в оціненні ступеня чистоти препарату ліпоксигенази за допомогою розділення білкових компонентів за молекулярною масою в поліакриламідному гелі в присутності SDS.

Принцип методу

SDS (натрій-додецилсульфат) — аніонний детергент, який:

руйнує вторинну/третинну структуру білків;

надає білкам однаковий негативний заряд, пропорційний довжині поліпептиду.

Унаслідок цього білки розділяються за розміром (молекулярною масою) під дією електричного поля у поліакриламідному гелі. Менші молекули рухаються швидше, більші — повільніше.

Обладнання та реактиви:

- Електрофоретична камера (наприклад, Mini-PROTEAN, Bio-Rad)
- Поліакриламідні гелі (зазвичай 10–12 %)

Буфери:

- Зразковий буфер (Laemmli buffer): Tris-HCl, SDS, гліцерин, β -меркаптоетанол (або DTT), бромфеноловий синій
- Буфер для електрофорезу: Tris-Glycine-SDS

Маркери білкової маси (Protein Ladder): 10–250 кДа

- Фарбування: Coomassie Brilliant Blue R-250 або срібне фарбування.

Підготовка зразків:

1. До білкового розчину (зразка ліпоксигенази) додають 4× зразковий буфер у співвідношенні 3:1.
2. Нагрівають при 95 °С протягом 5 хв (для денатурації білка).
3. Охолоджують і центрифугують коротко (для осадження можливих агрегатів).
4. Завантажують у лунку гелю 10–20 мкл зразка.
5. Електрофорез

Фарбування гелю:

- Після завершення електрофорезу гель виймають і фарбують у розчині Coomassie R-250 (0.1 % у метанолі/оцтовій кислоті).
- Потім знебарвлюють у розчині метанолу/оцтової кислоти до появи чітких білкових смуг.

Для ліпоксигенази сої (LOX-1, LOX-2, LOX-3) характерна смуга приблизно 95–100 кДа.

Якщо зразок має одну чітку смугу біля цієї маси — фермент очищено до гомогенності [3].

6.4 Визначення залишкової вологості методом Карла Фішера

Титрування за Карлом Фішером часто використовується як контрольний метод. Це хімічний аналіз на основі окиснення оксиду сірки йодидом у розчині метанолу [4].

При волюмометричному титруванні за методом Карла Фішера розчин із вмістом йодиду додається, доки не з'являться перші ознаки його надмірного вмісту. Кількість йодиду, який вступив у реакцію, визначається за обсягом бюретки, що містить реагент Фішера [4].

При кулонометричному титруванні йодид, що бере участь у реакції, утворюється електролітично безпосередньо в титриметричній комірці. Процес триває, поки не буде виявлено надлишковий йодид, який не бере участі в реакції. Відповідно до закону Фарадея, кількість води у зразку буде пропорційною до загальної кількості спожитого струму [4].

Норма залишкової вологості ліпоксигенази 10%, так як при такій вологості досягається дуже сильна інактивація LOX під впливом високої температури [5].

Для визначення залишкової вологості ліпоксигенази будемо використовувати волюмометричний метод.

Матеріали та обладнання

Титратор Карла–Фішера (волюмометричний) або набір реактивів (йодний розчин стандартної міцності для волюмометричного методу. Розчинник: абсолютний метанол (або метанол з модифікатором) [6].

Підготовка зразка

Визначте розмір навантаження: для волюмометричного КФ зазвичай беруть 0.1–0.8 г, залежно від очікуваної вологи і чутливості приладу [7].

Процедура (волюмометрична титрація)

Зважте аналітичну кількість сухого порошку (наприклад 0.3000 g) на аналітичних вагах; швидко внесіть зразок у титраційну камеру з розчинником [7].

Титрування: прилад проводить титрування до точки еквівалентності; зафіксуйте об'єм/масу витраченого реактиву. Проведіть щонайменше 2–3 паралельні визначення (реплікат) і розрахуйте середнє і стандартне відхилення [7].

РОЗДІЛ 7. Проект заявки на корисну модель

Корисна модель належить до біотехнологічної промисловості і стосується одержання мікробних ліпоксигеназ, які можуть бути використані як харчові добавки у харчовій промисловості, а саме у хлібо-булочній галузі.

Відомий спосіб одержання ліпоксигенази за допомогою рекомбінантного штаму *Pichia pastoris* CBS7435 WT Mut [Chiam Hashem et al., 2020, <https://doi.org/10.1002/biot.202000089>], який був сконструйований з *Pseudomonas aeruginosa*.

Його недоліком є низька активність ліпоксигенази, а саме 11.6 Од/мг. А також використання в якості індуктора гліцерин, що є причиною низької активності.

Ще один спосіб одержання ліпоксигенази, за допомогою рекомбінантного штаму *Pichia pastoris* з більшою активністю 111 Од/мг [Akiko Sugio et al., 2014, <https://doi.org/10.1016/j.pep.2014.01.004>], який був сконструйований з *Pleurotus sapidus*.

Недоліком цього способу є досить невелика активність ліпоксигенази, яка пов'язана з використанням індуктора ізопропіл β -D-тіогалактопіранозиду.

В основу корисної моделі поставлено задачу створення нового способу одержання мікробних ліпоксигеназ з високою активністю за допомогою використання середовища з автоіндукцією.

					НУХТ БТЕК 02.01.19 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 7. Проект заявки на корисну модель	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Піхало В. О.						
Перевір.		Красінко В.О.					96	1
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб одержання ліпоксигеназ включає культивування штаму *E. coli* BL21 (DE3) у середовищі з автоіндукцією (ZYM-5052). Метод автоіндукованого культивування лактози не потребує контролю концентрації клітин та вхідного індуктора (IPTG), що робить високощільну культуру генетично модифікованих бактерій більш простою та зручною.

Причинно-наслідковий зв'язок між запропонованими ознаками і очікуваним технічним результатом полягає в наступному. При використанні середовища з автоіндукцією є можливість збільшити вихід щільності клітин і активності ферменту.

Спосіб здійснюється наступним чином. На основі *Pseudomonas aeruginosa* створено рекомбінантний штам *E. coli* BL21(DE3). Ген LOX був ампліфікований за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з очищеної *P. aeruginosa*. Геномна ДНК ATCC27853 і антисмисловий праймер були розроблені на основі *P. aeruginosa* PAO1 LOX послідовності і були використані для клонування повнорозмірного гена LOX (pse-LOX). Ампліфікований фрагмент розміром 2,0 kb вставляли в рMD 19-T. Після секвенування, отримане похідне рMD 19-T, що кодує правильний ген LOX, було названо рMD19T-pse-LOX. Плазмиди рMD19T-pse-LOX і рЕТ-23а (b) були розщеплені. Отриманий фрагмент розміром 2,0 kb клонували в сайт BamH I рЕТ23а (b) для створення рЕТ-23а/pse-LOX. Рекомбінантну плазмиду рЕТ23а/pse-LOX трансформували в клітини *E. coli* BL21. Нічну культуру рекомбінантного штаму інокулювали у середовищі ZYM-5052, а потім інкубували в ротаційному шейкері з тими ж умовами (180 об/хв, 37 C). Середовище ZYM-5052 складається з 1% N-Z-аміну AS, 0,5% дріжджового екстракту, 0,05% глюкози, 0,5% гліцерину, 0,2% лактози, 25 мМ Na₂HPO₄, 25 мМ KH₂PO₄, 50 мМ NH₄Cl, 5 мМ Na₂SO₄, змішаний розчин 2 мМ MgSO₄ і 0,2 сліди металу, 1000 розчин складався з змішаних сліди металу 50 мМ FeCl₃, 20 мМ CaCl₂, 10 мМ MnCl₂, 10 мМ ZnSO₄, 2 мМ 20 CoCl₂, 2 мМ CuCl₂,

2 мМ CuCl₂, NiCl₂, 2 мМ Na₂MoO₄ та 2 мМ H₃BO₃. Коли оптична щільність культури при 600 нм досягла 0,6, температуру знизили до 16°C і продовжували струшувати при 180 об/хв протягом 44 годин.

Зібрані клітини ресуспендували в буфері для лізису, який складався з 50 мМ калій-фосфатного буфера (рН 6,0), 300 мл/л гліцерину, 3 мл/л Triton X-100 і 5 мМ імідазолу, а потім розбивали ультразвуком. Залишки клітин видаляли центрифугуванням. Розчинну фракцію порційно завантажували на 2 мл заряджену нікелем NTA агарозну колонку, яка була попередньо врівноважена буфером для лізису. Цільовий білок елюював імідазолом у діапазоні 100–150 мМ. Активні фракції об'єднували і діалізували проти 10 мМ калій-фосфатного буфера (рН 6,0).

Приклад. Порівняння активності ліпоксигенази при додаванні індуктора IPTG та при використанні середовища з автоіндукцією.

Рекомбінантну плазмиду pET23a/pse-LOX трансформували в клітини *E. coli* BL21, і одну колонію клітин *E. coli* BL21 (DE3), що містили плазмиду pET-23a/pse-LOX, інокулювали в 30 мл середовища LB, що містило 100 мг/мл ампіциліну, при температурі 37°C. Для експресії з індукцією IPTG 1 мл нічної культури рекомбінантного штаму інокулювали в 250 мл колбу, що містила 50 мл середовища LB. Суміш інкубували в роторному шейкері при 180 об/хв, 37°C. Коли клітини досягли фази експоненціального росту (OD₆₀₀ = 0,6e0,8), потім додавали IPTG (100 мг/мл) для індукції вироблення ферменту при 16°C протягом 44 годин. З іншого боку, при автоіндукційній експресії 1 мл нічної культури рекомбінантного штаму інокулювали в колбу об'ємом 250 мл, що містила 50 мл середовища ZYM-5052, а потім інкубували в роторному шейкері за тих самих умов (180 об/хв, 37°C). Середовище ZYM-5052 складалося з 1% N-Z-аміну AS, 0,5% дріжджового екстракту, 0,05% глюкози, 0,5% гліцерину, 0,2% лактози, 25 мМ Na₂HPO₄, 25 мМ KH₂PO₄, 50 мМ NH₄Cl, 5 мМ Na₂SO₄, 2 мМ MgSO₄ та 0,2 розчину слідової суміші металів. Змішаний розчин 1000 мікроелементів складався з 50 мМ FeCl₃, 20 мМ CaCl₂, 10 мМ MnCl₂, 10 мМ

ZnSO₄, 2 мМ 20 CoCl₂, 2 мМ CuCl₂, 2 мМ CuCl₂, NiCl₂, 2 мМ Na₂MoO₄ та 2 мМ H₃BO₃. Коли оптична густина культури при 600 нм (OD₆₀₀) досягла 0,6, температуру знизили до 16°C та продовжили струшувати зі швидкістю 180 об/хв протягом 44 годин.

Активність LOX визначали спектрофотометрично при 35°C шляхом вимірювання збільшення поглинання при 234 нм. Емульсію субстрату готували в день аналізу. Розчин субстрату містив 27 мл лінолевої кислоти, 25 мл Tween-20, 1,1 мл 0,5 М NaOH, а потім розводили до 50 мл фосфатним буфером. Реакційна суміш містила 20 мл розчину субстрату, 10 мл розчину ферменту та 2,97 мл фосфатного буфера. Збільшення активності LOX на 0,001 за хвилину при 234 нм визначається як 1 U активності LOX.

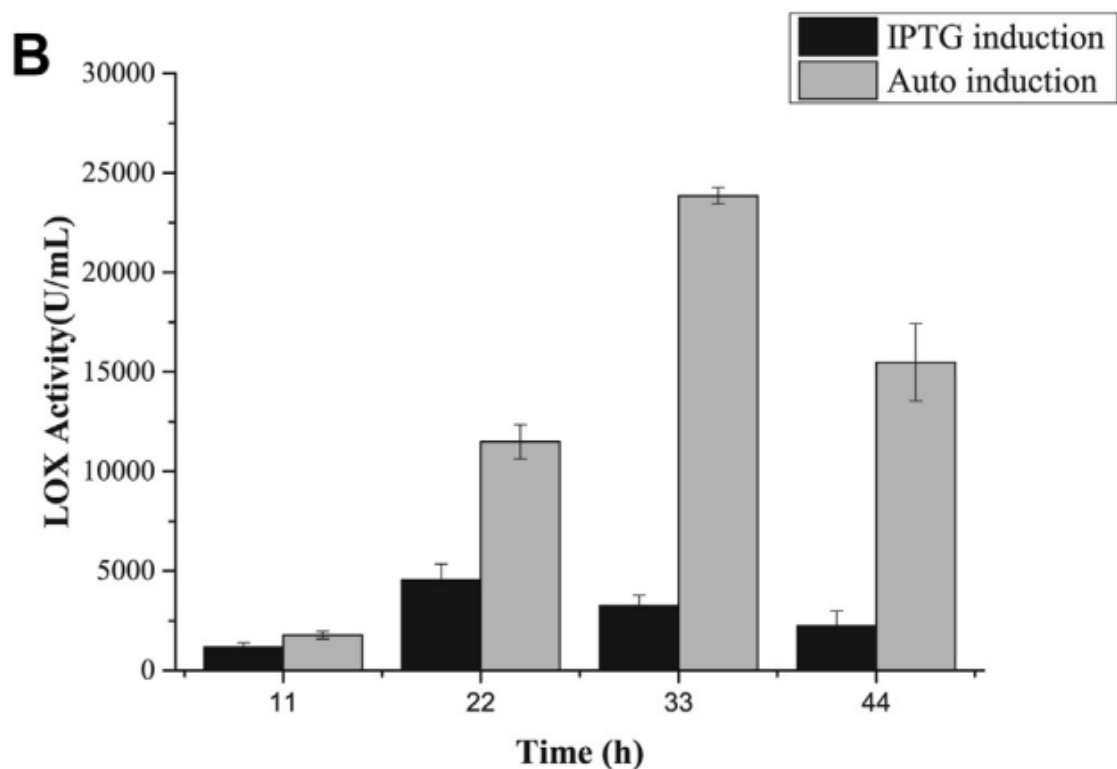


Рис 7.1. Вплив часу експресії під час культивування, виконаного двома методами індукції (автоіндукція та індукція IPTG), на активність LOX (Jing Lu et al., 2019)

Дані наведені на графіку В свідчать, що активність ліпоксигенази є значно вищою при культивуванні рекомбінатного штаму *E. coli* BL21 в середовищі з автоіндукцією ніж при використанні індуктора IPTG.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб одержання мікробної ліпоксигенази за допомогою рекомбінантного штаму *E. coli* BL21 **відрізняється тим, що** при культивуванні цього штаму використовують середовище з автоіндукцією ZYM-5052.

ВИСНОВКИ

У ході виконання кваліфікаційної роботи було встановлено актуальність виробництва та використання мікробних рекомбінантних ліпоксигеназ у доклінічних дослідженнях протизапальних препаратів. Було розроблено схему виділення та очищення мікробних ліпоксигеназ.

Проведений аналіз літературних даних показав, що правильно підібрані умови культивування і методи очищення дозволяють отримати ліпоксигенази з високим ступенем активності та чистоти. Це є важливою передумовою для подальшого їхнього застосування в біомедичних дослідженнях, зокрема у вивченні метаболізму поліненасичених жирних кислот, механізмів запальних процесів.

Розроблений біотехнологічний процес виділення ліпоксигенази включає в себе етапи: лізису біомаси гомогенізатором високого тиску, нікель-афінну хроматографію, діаліз та сублимацію готового продукту.

Таким чином, поставлені у роботі завдання були успішно виконані, а здобуті дані підтвердили актуальність і перспективність використання мікробних ліпоксигеназ у сучасних доклінічних дослідженнях

					НУХТ БТЕК 02.01.19 КР ПЗ		
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ВИСНОВКИ		
Розроб.		Піхало В. О.					
Перевір.		Красінько В.О.					
Консультант							
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
					Літ.	Арк.	Акрушів
						101	1
					Кафедра БТМ		

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. An, J.-U., Hong, S.-H., & Oh, D.-K. (2018). Regiospecificity of a novel bacterial lipoxygenase from *Mycrococcus xanthus* for polyunsaturated fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Lipids*. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2018.04.014>
2. An, J.-U., Lee, I.-G., Ko, Y.-J., & Oh, D.-K. (2019). Microbial synthesis of linoleate 9S lipoxygenase derived plant C18 oxylipins from C18 polyunsaturated fatty acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05857>
3. Bao, R. M., Yang, H. M., Yu, C. M., Zhang, W. F., & Tang, J. B. (2016). An efficient protocol to enhance the extracellular production of recombinant protein from *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 126, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2016.05.007>
4. Bessarabov, V. I., & Zderko, N. P. (2023). Механізм інгібування 15-ліпоксигенази діосміном. <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2023.2.14053>
5. Brodhun, F., Cristobal-Sarramian, A., Zabel, S., Newie, J., Hamberg, M., & Feussner, I. (2013). An iron 13S-lipoxygenase with an α -linolenic acid specific hydroperoxidase activity from *Fusarium oxysporum*. *PLOS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064919>
6. Bruno, F., Spaziano, G., Liparulo, A., Roviezzo, F., Nabavi, S. M., Sureda, A., Filosa, R., & D'Agostino, B. (2017). Recent advances in the search for novel 5-lipoxygenase inhibitors for the treatment of asthma. *European Journal of Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.10.020>
7. Chrisnasari, R., Hennebelle, M., Vincken, J.-P., van Berkel, W. J. H., & Ewing, T. A. (2022). Bacterial lipoxygenases: Biochemical characteristics, molecular structure and potential applications. *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108046>
8. Dainese, E., Sabatucci, A., van Zadelhoff, G., Angelucci, C. B., Vachette, P., Veldink, G. A., Finazzi Agrò, A., & Maccarrone, M. (н.д.). Structural stability of soybean lipoxygenase-1 in solution as probed by SAXS.
9. Ehgartner, D., Sagmeister, P., Langemann, T., Meitz, A., Lubitz, W., & Herwig, C. (2017). Recovery of inclusion body protein from recombinant *E. coli* using phage Φ X174-derived lysis protein E. *Applied Microbiology*

- and Biotechnology, 101(14), 5603–5614. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8281-x>
10. European Pharmacopoeia. (н.д.). 2.6.12 – Microbiological examination of non-sterile products: microbial enumeration tests.
 11. Fong-Chin Huang, & Schwab, W. (2011). Cloning and characterization of a 9-lipoxygenase gene from *Nicotiana benthamiana*. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-30>
 12. Hashem, C., Stolterfoht, H., Rinnofner, C., Steinberger, S., Winkler, M., & Pichler, H. (2020). Secretion of *Pseudomonas aeruginosa* lipoxygenase by *Pichia pastoris* upon glycerol feed. *Biotechnology Journal*. <https://doi.org/10.1002/biot.202000089>
 13. Hatanaka, A., Kajiwara, T., Matsui, K., & Ogura, M. (1990). Studies on substrate specificity of soybean lipoxygenase-1. <https://doi.org/10.1515/znc-1990-11-1213>
 14. He, Y., Zhang, C., Qian, H., et al. (2016). Optimization of fermentation conditions for lipoxygenase production by recombinant *E. coli*. <https://doi.org/10.7506/spkx1002-6630-201615025>
 15. Heshof, R., de Graaff, L. H., Villaverde, J. J., Silvestre, A. J. D., Haarmann, T., Dalsgaard, T. K., & Buchert, J. (2015). Industrial potential of lipoxygenases. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1004520>
 16. Kelle, S., Zelena, K., Krings, U., Linke, D., & Berger, R. G. (2014). Expression of soluble recombinant lipoxygenase from *Pleurotus sapidus* in *Pichia pastoris*. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2014.01.004>
 17. Kuhn, H., Banthiya, S., & van Leyen, K. (2015). Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2014.10.002>
 18. Lu, J., Zhang, C., Leong, H. Y., Show, P. L., Lu, F., & Lu, Z. (2019). Overproduction of lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* by auto-induction. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.09.006>
 19. Lu, X., Zhang, J., Liu, S., et al. (2013). Overproduction, purification, and characterization of extracellular lipoxygenase of *Pseudomonas aeruginosa* in *E. coli*. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4457-6>
 20. Mnif, I., & Ghribi, D. (2016). Glycolipid biosurfactants: properties and potential applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(13), 4310–4320. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7759>

21. Newcomer, M. E., & Brash, A. R. (2015). Structural basis for specificity in lipoxygenase catalysis. <https://doi.org/10.1002/pro.2626>
22. Newie, J., Andreou, A., Neumann, P., Einsle, O., Feussner, I., & Ficner, R. (2020). Crystal structure of a lipoxygenase from *Cyanothece* sp. [https://www.jlr.org/article/S0022-2275\(20\)35463-8/fulltext](https://www.jlr.org/article/S0022-2275(20)35463-8/fulltext)
23. Orientador, J. H. (2013). Clonagem, expressão e caracterização de duas lipoxigenases de *Shewanella woodyi*. <https://repositorio.unesp.br/items/90df2148-cdbc-48de-b0b1-019976aac4d9>
24. Pang, C., Liu, S., Zhang, G., Zhou, J., Du, G., & Li, J. (2022). Enhancing extracellular production of lipoxygenase in *E. coli* by signal peptides and autolysis system. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01772-x>
25. Pang, C., Zhang, G., Liu, S., Zhou, J., Li, J., & Du, G. (2022). Engineering sigma factors and chaperones for enhanced heterologous lipoxygenase production in *E. coli*. *Biotechnology for Biofuels*. <https://doi.org/10.1186/s13068-022-02206-x>
26. Qian, H., Xia, B., He, Y., Lu, Z., Bie, X., Zhao, H., Zhang, C., & Lu, F. (2017). Protein Expression and Purification. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.05.006>
27. Stasevich, M. V., та ін. (2018). Технологічне обладнання фармацевтичної та біотехнологічної промисловості. Львів: НОВИЙ Світ–2000.
28. Sugio, A., Østergaard, L. H., Matsui, K., & Takagi, S. (2018). Characterization of two fungal lipoxygenases expressed in *Aspergillus oryzae*. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.04.005>
29. Takahashi, S., Reina, G. Y., & Shiiba, K. (2024). Production of recombinant intact and truncated LOX III in *Saccharomyces cerevisiae*. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2024.100195> USP. (н.д.). <921> Water determination. <https://www.drugfuture.com/>
30. Xia, B., Chi, H., Zhang, B., Lu, Z., Liu, H., Lu, F., & Zhu, P. (2023). Computational insights and characterization of mini-lipoxygenase from *Nostoc sphaeroides*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 7941. <https://doi.org/10.3390/ijms2409794>

31. Zhang, B., Chi, H., Shen, J., Tao, Y., Lu, Z., & Lu, F. (2023). Improved catalytic performance of lipoxygenase from *Enterovibrio norvegicus* via directed evolution. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1305582>
32. Zhang, B., Chen, M., Xia, B., Lu, Z., Khoo, K. S., Show, P. L., & Lu, F. (2022). Characterization and preliminary application of a novel lipoxygenase from *Enterovibrio norvegicus*. <https://doi.org/10.3390/foods11182864>
33. Zhang, C., Tao, T., Ying, Q., Zhang, D., Lu, F., Bie, X., & Lu, Z. (2012). Extracellular production of lipoxygenase from *Anabaena* sp. PCC 7120 in *Bacillus subtilis*. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3895->