

# БИОКАТАЛИЗАТОРЫ НА ОСНОВЕ МЕТИЛОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ И ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ НИХ ФЕРМЕНТОВ КАК РАСПОЗНАЮЩИЕ ЭЛЕМЕНТЫ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИХ БИОСЕНСОРОВ

Т. А. Кузнецова

Тульский государственный университет, Тула

tatulyakuz@mail.ru

Аэробные метилотрофные бактерии, особенность которых — наличие в периплазме PQQ-зависимых дегидрогеназ, связанных с дыхательной цепью бактерий, способны окислять токсичные одноуглеродные соединения и могут служить основой при создании биоаналитических систем мониторинга  $C_1$ -соединений в природных и антропогенно загрязненных экосистемах, а также в культуральной жидкости метилотрофов при биотехнологических процессах. Ключевым ферментом метаболизма  $C_1$ -соединений у метилотрофных бактерий служит PQQ-зависимая метанолдегидрогеназа (МДГ). Окислительно-восстановительные свойства, независимость от кислорода и специфичность МДГ становятся основой для создания высокочувствительных биосенсоров и эффективных биотопливных элементов. Оттого изучение биокалитических свойств метилобактерий и очищенной МДГ в качестве биокатализаторов в амперометрическом биосенсоре представляется интересной и актуальной задачей.

В работе использовали штаммы бактерий *Methylovorus mays* ВКМ В-2221, *Methylobacterium mesophilicum* JCM 2829, *Methylobacterium dichloromethanicum* ДМ4, *Methylobacterium nodulans* ORS2060Т, которые были предоставлены лабораторией метилотрофных бактерий Института биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г. К. Скрыбина РАН, г. Пушкино.

Электрохимические измерения проводили при помощи амперометрической биосенсорной системы «IPC-Micro» («Kronas», Москва), интегрированной с ПК. В качестве рабочего электрода использовали медиаторный электрод на основе графитовой пасты с добавлением 10 % ферроцена в качестве медиатора электронного транспорта с иммобилизованными на поверхности биокатализаторами. Электродом сравнения служил хлорсеребряный электрод. Отклики медиаторных биосенсоров получали в виде зависимости силы тока от времени при соответствующем

рабочем потенциале (250 мВ), за ответ сенсора принимали амплитуду изменения силы тока до и после введения субстрата в измерительную кювету.

Нами было высказано предположение, что использование разрушенных клеток бактерий в качестве биокатализаторов увеличит доступность ферментных систем, в том числе МДГ, для медиатора ферроцена. Целые клетки бактерий, выращенные до экспоненциальной фазы роста, разрушали ультразвуком и получали бесклеточный экстракт и мембранную фракцию. Учитывая тот факт, что дегидрогеназы метиловых бактерий имеют цитоплазматическую (формальдегиддегидрогеназа) и мембранную локализацию (МДГ), для дальнейших исследований использовали бесклеточный экстракт и фракцию суммарных мембран в качестве биокатализаторов наряду с целыми клетками. Очистка МДГ включала следующие последовательные стадии: разрушение клеток ультразвуком, фракционное осаждение сульфатом аммония, ионообменную хроматографию на анионите ДЭАЭ-сефарозе, хроматографию на геле гидроксилпатита, катионообменную хроматографию и ультрафильтрацию. В результате очистки и концентрирования был получен гомогенный препарат МДГ с удельной активностью 3,9 Ед/мг белка и концентрацией белка 6,7 мг/мл, который использовали в качестве биокатализатора в биосенсоре.

При изучении субстратной специфичности рецепторных элементов показано, что для всех типов биорецепторов наибольшие отклики сенсора получены на метанол и его гомологи (С1-С5) и формальдегид (ФА), причем биосенсор на основе мембранных фракций *M. dichloromethanicum* оказался селективен по отношению к ФА, поэтому сравнительная характеристика биосенсоров приведена для этого субстрата. Аналитические и метрологические характеристики биосенсоров рассчитывались путем обработки градуировочных зависимостей откликов сенсора от концентрации субстрата в кювете уравнением, подобным уравнению ферментативной кинетики Михаэлиса-Ментен. Полученные характеристики приведены в таблице 1.

Биорецептор на основе бесклеточного экстракта бактерий *M. dichloromethanicum* характеризуется лучшим показателем коэффициента чувствительности, по сравнению с целыми клетками и мембранными фракциями, что может быть связано с тем, что в бесклеточном экстракте доступность фермента больше.

**Аналитические и метрологические характеристики  
биосенсора на основе разных препаратов  
метилотрофных бактерий, субстрат ФА**

Характеристика биосенсора	Тип биоматериала, используемого в качестве рецепторного элемента			
	Клеточная суспензия <i>M. mays</i>	Бесклеточный экстракт <i>M. dichloro-methanicum</i>	Мембранная фракция <i>M. dichloro-methanicum</i>	МДГ <i>M. nodulans</i>
Предел обнаружения, мМ	0,14 0,03*	0,06	0,05	0,06 0,0045*
Верхняя граница линейного диапазона определяемых концентраций, мМ	8 ± 1 0,33 ± 0,02*	7,9 ± 0,4	7,0 ± 0,5	4,2 ± 0,4 0,49 ± 0,03*
Коэффициент чувствительности, нА/мМ	21 ± 1 980 ± 90*	42 ± 2	25 ± 3	560 ± 50 7200 ± 300*
Повторяемость, отклонение от среднего значения за 15 измерений, %	4,2	6,6	7,3	7,6
Стабильность, потеря активности за 10 сут, %	95	33	63	12

\*Субстрат метанол

Биорецептор на основе очищенного препарата МДГ обладает наилучшим показателем коэффициента чувствительности. Однако уменьшение линейного диапазона определяемых концентраций за счет снижения верхней границы определяемых концентраций ( $K_m$ ) не всегда удобно для определения концентрации в пробе, т. к. требуется дополнительное разведение образца.

Показано, что биорецептор на основе целых клеток обладает хорошей операционной стабильностью и пригоден для большого числа

измерений. В свою очередь, биорецепторы на основе мембранных фракций и бесклеточных экстрактов селективны и чувствительны по отношению к ФА.

Коэффициент чувствительности к метанолу возрастает на порядок при использовании очищенной МДГ по сравнению с целыми клетками, а также расширяется линейный диапазон определяемых концентрация метанола, и улучшается долговременная стабильность сенсора. Таким образом, высокая стабильность и сродство к метанолу делает МДГ *M. nodulans* перспективным биокатализатором при разработке амперометрического биосенсора.

WHOLE CELLS, MEMBRANE FRACTIONS AND ENZYME MDH  
OF METHYLOBACTERIA AS A BIOCATALYSTS  
IN AMPEROMETRIC BIOSENSOR.

*T. A. Kuznetcova*  
*Tula state university, Tula*

**Summary.** The results of the bioelectrocatalytic processes investigation of formaldehyde and methanol oxidation by the whole cells, membrane fractions and enzyme MDH of methylobacteria in the presence of ferrocene are presented. It was shown that such systems can be useful for development of amperometric biosensors for monitoring one-carbon compounds.

*Работа выполнена при поддержке Российского фонда  
фундаментальных исследований (грант 11-04-97544-р\_центр\_а)*