

УДК 579.6: 543.94

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОЙ МЕТАНОЛДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ *METHYLOBACTERIUM EXTORQUENS* pCM 160

Т.А. Кузнецова, Т.А. Белякова, А.В. Катыхина

Тульский государственный университет, Тула, Россия

Уникальный метаболизм метиловых бактерий позволяет использовать их клетки и ферменты в биоаналитике, что является доступной альтернативой дорогостоящим и сложным физико-химическим методам обнаружения [1, 2]. Клетки этих бактерий характеризуются высокой концентрацией периплазматических дегидрогеназ, основной из которых является пирролохинолинхинон (РҚҚ) – зависимая метанолдегидрогеназа (МДГ) – фермент, катализирующий окисление метанола до формальдегида, а также способный окислять первичные спирты и альдегиды, используя искусственные акцепторы электронов, такие как феназинметосульфат (ФМС) и 2,6-дихлорфенолиндифенол (ДХФИФ) [3–5]. Использование метиловых бактерий и выделенной из них МДГ при разработке биоаналитических систем является перспективным направлением развития аналитической биотехнологии. Изучение биокаталитических свойств метиловых бактерий играет важную роль в разработке и создании новых биосенсорных элементов для анализа C_1 -соединений. Для повышения эффективности таких биосенсоров путем увеличения активности и стабильности фермента МДГ, необходимо подобрать оптимальные условия роста и культивирования метиловых бактерий, условия хранения, изучить влияние посторонних примесей в виде солей тяжелых металлов. Таким образом, целью работы явилось выявление влияния различных факторов на биокаталитические свойства рекомбинантной МДГ из *Methylobacterium extorquens* pCM 160.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Микроорганизмы. В работе использовали рекомбинантный штамм метиловых бактерий *Methylobacterium extorquens* pCM160 [6].

Условия культивирования. Микроорганизмы выращивали на качалке (180 об/мин) при 29 °С в колбах Эрленмейера с 200 мл среды Канеда, содержащей (г/л): KH_2PO_4 – 2, $(NH_4)_2SO_4$ – 2, NaCl – 0,5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,025, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,002, pH 7,2. Метанол и канамицин вносили в стерильные среды до концентрации 0,5 % (по объему) и 50 мкг/мл, соответственно. Клетки микроорганизмов отделяли центрифугированием при 10000 г в течение 20 минут и промывали 50 мМ калий фосфатным буфером, pH 7,2.

Получение бесклеточного экстракта. Клетки, собранные в разные дни роста ресуспендировали в 50 мМ калий фосфатном буфере (pH 7,2). Полученную суспензию разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе (УЗД) MSE150 (Англия) при охлаждении льдом: 12 циклов по 10 секунд с интервалом 60 секунд, центрифугировали при 30 000 г в течение 30 мин при 4 °С. Полученный бесклеточный экстракт использовали для дальнейших опытов.

Определение активности. Активность МДГ определяли спектрофотометрически при 30 °С с ФМС и ДХФИФ в качестве акцепторов электронов. Анализируемая смесь содержала 1,5 мл 100 мМ Трис-НСl, pH 9,0, 300 мкл деионизованной воды, 50 мкл 10 мМ CH_3OH , 50 мкл 87 мМ ДХФИФ, 50 мкл 1,1 мМ ФМС и фермент (10 – 50 мкл). Буфер готовили с добавлением NH_4Cl и KCN. Смесь, содержащую буфер (Трис-НСl + NH_4Cl + KCN), воду и метанол инкубировали в течение 5 минут, и затем добавляли акцепторы электронов ДХФИФ и ФМС, и измеряли тангенс неспецифической реакции ($\Delta OP_{600} / \text{мин Контроль}$). Реакцию инициировали добавлением экстракта, активность МДГ определяли путем измерения уменьшения поглощения ДХФИФ при 600 нм ($\epsilon = 1,9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) за 1 мин, реакция проходит в пределах 15–45 сек.

$$\text{Активность (Ед./мл)} = \frac{(\Delta OP_{600} / \text{мин Опыт} - \Delta OP_{600} / \text{мин Контроль}) \times V_{\text{реакц. смеси, мл}} \times f}{19 \times V_{\text{образца, мл}}}$$

$$\text{Удельная активность (Ед. / мг белка)} = (\text{Ед. / мл}) \times 1/C$$

где f – коэффициент разбавления исходного раствора препарата фермента; 19 – коэффициент миллимолярной экстинкции ДХФИФ при 600 нм, pH 9,0, $M^{-1}cm^{-1}$; $V_{\text{образца}}$ – объем образца в мл; C – концентрация белка в исходном растворе, мг/мл. За единицу активности принимали количество МДГ, которое катализирует за минуту превращение 1 мкмоль метанола в формальдегид при pH 9,0 и 30 °С.

Белок в экстрактах определяли методом Лоури, в качестве стандартного белка использовали раствор БСА.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Зависимость активности МДГ от времени роста метиловых бактерий.

Предполагается, что максимальная активность МДГ в бесклеточном экстракте должна приходиться на 1–3 сутки роста метиловых бактерий, что соответствует фазе ускорения роста и экспоненциальной фазе, в которых наблюдается максимальная скорость деления клеток и клеточная популяция считается наиболее жизнеспособной. Для выявления зависимости активности фермента от времени роста бактерий были отобраны 5 образцов биомассы на разные сутки роста бактерий. Биомассу разрушали на УЗД как описано в методике и определяли активность и концентрацию белка. Результаты измерений представлены на рис. 1.

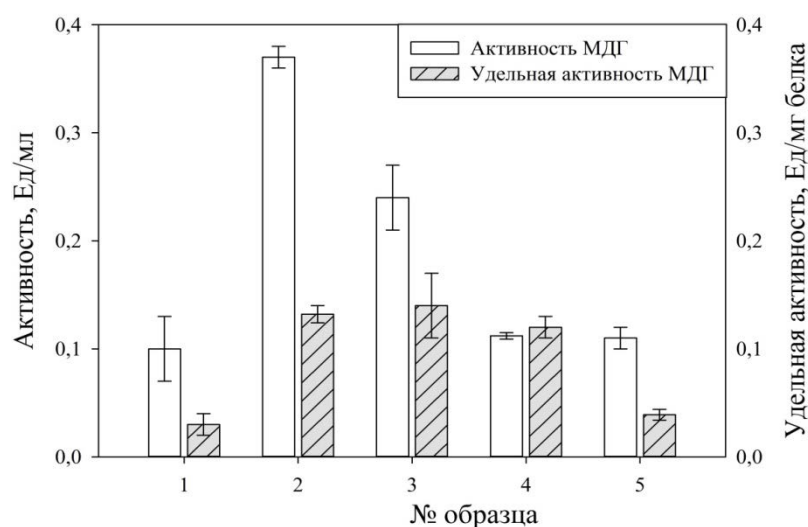


Рис. 1. Изменение активности и удельной активности МДГ бесклеточном экстракте *M. extorquens* pCM160 в зависимости от времени роста бактерий.

Результаты эксперимента показали, что наивысшая активность МДГ в бесклеточном экстракте *M. extorquens* pCM160 приходится на вторые сутки ($0,37 \pm 0,01$ Ед./мл), а удельная активность на третьи сутки ($0,14 \pm 0,03$ Ед./мг белка). В первые, четвертые и пятые сутки активность фермента ниже, что характерно для стационарной фазы и фазы отмирания микроорганизмов, когда лимитирующим фактором является нехватка питательных ресурсов, а процент погибших клеток превышает процент выросших. На основе полученных результатов предлагается для получения биоматериала с наивысшей активностью фермента МДГ проводить сбор биомассы не позднее третьих суток, когда клетки находятся в экспоненциальной фазе роста.

Определение кинетических параметров фермента МДГ в бесклеточном экстракте M. extorquens pCM160.

Из литературных данных известно, что фермент МДГ не является высокоспецифичным и окисляет многие первичные соединения и небольшую часть вторичных, но проявляет повышенную окислительную активность по отношению к метанолу [7]. При изучении субстратной специфичности МДГ в бесклеточном экстракте *M. extorquens* pCM160 было показано, что максимальная активность и удельная активность приходится на такие субстраты, как метанол ($1,33 \pm 0,05$ Ед./мл и $1,2 \pm 0,1$ Ед./мг белка), этанол ($1,1 \pm 0,1$ Ед./мл и $0,99 \pm 0,05$ Ед./мг белка) и бутанол-1 ($1,12 \pm 0,07$ Ед./мл и $1,0 \pm 0,1$ Ед./мг белка). Поэтому данные субстраты использовали для определения кинетических параметров ферментативной реакции (рис. 2).

Полученные зависимости аппроксимировали к уравнению Михаэлиса-Ментен для описания кинетики ферментных реакций в гомогенных условиях, значения кинетических параметров для всех используемых в работе субстратов приведены в таблице 1.

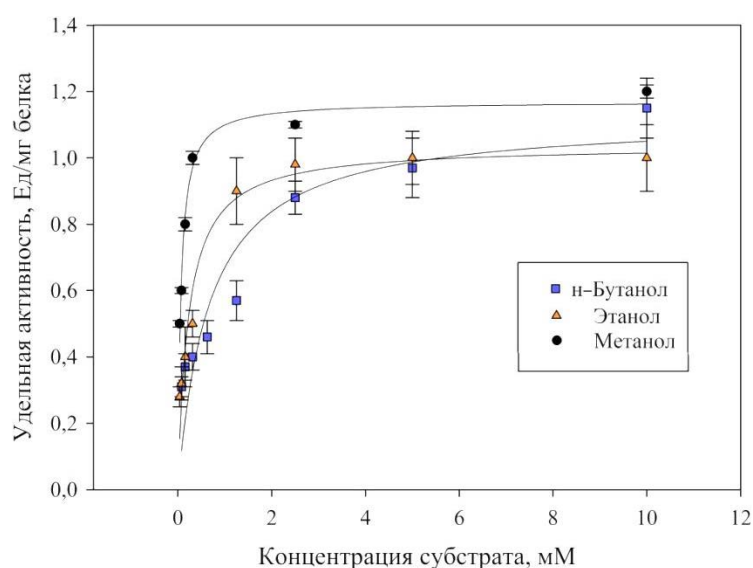


Рис. 2. Зависимость удельной активности МДГ в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM160 от концентраций спирта.

Таблица 1. Параметры уравнения Михаэлиса-Ментен для МДГ из бесклеточного экстракта *M.extorquens*pCM160

Параметр	метанол	этанол	н-бутанол
$V_{\max}$, Ед./мг белка	$1,17 \pm 0,03$	$1,04 \pm 0,05$	$1,04 \pm 0,06$
Кажущиеся K_M , мМ	$0,064 \pm 0,008$	$0,23 \pm 0,05$	$0,5 \pm 0,1$
R	0,9894	0,9786	0,9899

Анализируя полученные данные, можно выявить зависимость уменьшения K_M с увеличением длины углеводородного радикала, максимальная скорость ($V_{\max}$) для трех субстратов находится практически на одинаковом уровне. Наименьшая K_M характерна для метанола ($0,064 \pm 0,008$ мМ), что свидетельствует о высшем сродстве фермента МДГ *M.extorquens* pCM160 к данному субстрату и согласуется с литературными данными (0,01–0,45 мМ [8]).

Влияние солей металлов на активность фермента МДГ в бесклеточном экстракте M. extorquens pCM160

Скорость ферментативной реакции, как и активность фермента, в значительной степени определяется присутствием в среде активаторов и ингибиторов, которые могут ускорять или тормозить протекание реакции. В ряде случаев ионы металлов (Co^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+}) выполняют функции простетических групп ферментов, могут служить акцепторами или донорами электронов, или выступать в качестве электрофилов либо нуклеофилов, сохраняя реакционные группы в необходимой ориентации. В других случаях они способствуют присоединению субстрата к активному центру и образованию фермент-субстратного комплекса. Ионы же тяжелых металлов (Cu^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+}) могут являться неспецифичными ингибиторами и приводить к необратимой денатурации белковой части фермента. Поэтому было решено проверить влияние ионов металлов на биокаталитические свойства фермента МДГ в бесклеточном экстракте *M. extorquens* pCM160. Измерения проводили по стандартной методике определения активности фермента с использованием метанола в качестве субстрата и с добавлением растворов солей металлов в конечной концентрации в кювете 1 мМ. Значения удельных активностей МДГ в присутствии солей металлов выразили в процентах по отношению к контрольному раствору (табл. 2).

Эксперименты показали, что незначительное увеличение активности МДГ в бесклеточном экстракте наблюдается при внесении раствора соли Ca^{2+} (на 13 %), что может быть связано с наличием данного иона металла в активном центре фермента [9]. Из литературных данных известно, что ион Ca^{2+} , благодаря своим координационным связям с кислородом на карбонильном атоме C_5 в молекуле RQQ, стабилизирует его для атаки оксианионом или гидрид-ионом в механизме прямого гидридного переноса [10]. Поэтому добавление раствора данного иона может способствовать лучшей стабилизации активного центра и, как следствие, повышению активности МДГ.

Таблица 2. Влияние солей металлов на активность МДГ в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM160

Вещество	Активность МДГ, %
Контроль	100,00± 0,02
NaCl	103,6± 0,9
CaCl ₂	113± 2
CoSO ₄ ·7H ₂ O	45,1± 0,8
Pb(CH ₃ COO) ₂	93± 2
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	90,51± 0,07
MgSO ₄ ·7H ₂ O	94± 2
MnSO ₄ ·5H ₂ O	91± 1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0

Незначительное снижение активности наблюдается при добавлении растворов солей Pb²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺ и Mn²⁺. Стоит отметить сильное ингибирование фермента раствором соли Co²⁺ (на 55 %) и полное подавление активности раствором соли Cu²⁺. Случаи сильного ингибирования ферментов солями меди описаны во многих литературных источниках [11,12], в том числе и снижение активности МДГ [13].

Стабильность фермента в бесклеточном экстракте M.extorquens pCM160 при различных условиях хранения.

Для изучения стабильности МДГ были подготовлены 2 образца бесклеточного экстракта *M.extorquens* pCM160, хранение которых проводили двумя способами – при + 4 °С и -20 °С. При этом провели мониторинг изменения активности фермента МДГ (рис. 3).

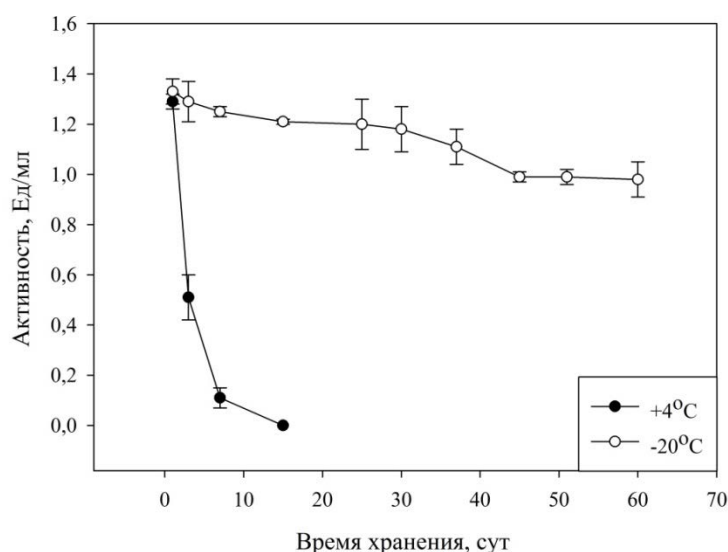


Рис. 3. Удельная активность МДГ в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM160 при хранении.

Эксперименты показали, что образец бесклеточного экстракта *M.extorquens* pCM160, хранившийся при -20°С, за 60 суток потерял 26 % активность, что позволяет использовать данный биоматериал для дальнейших измерений. Хранение экстракта при +4°С не позволяет использовать биоматериал в биосенсорном анализе в долгосрочной перспективе, т. к. за 6 суток активность фермента снизилась на 90 %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе полученных результатов предлагается для получения биокатализатора с наивысшей активностью фермента МДГ, проводить сбор биомассы не позднее третьих суток, бесклеточный экстракт хранить при 20 °С и ниже. В ходе работы была подтверждена зависимость уменьшения удельной активности МДГ в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM160 с увеличением длины и разветвленности углеводородного радикала (в ряду метанол (1,2 ± 0,1 Ед./мг белка) > этанол (0,99 ± 0,05 Ед./мг белка) > н-бутанол (1,0 ± 0,1 Ед./мг белка). Наименьшая К_М соответствует метанолу (0,064 ± 0,008 мМ), что свидетельствует о более высоком сродстве фермента МДГ к данному субстрату.

Анализ влияния растворов солей металлов на активность МДГ показал, что внесение раствора соли Ca^{2+} повышает активность фермента на 13 %, что может быть связано с наличием данного иона металла в активном центре. Незначительное изменение активности наблюдается при добавлении растворов солей Na^+ , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} и Mn^{2+} , в то время как под действием раствора соли Co^{2+} происходит сильное ингибирование фермента (на 55 %), а при внесении раствора соли Cu^{2+} – полное подавление активности.

ЛИТЕРАТУРА

- Aerobic methylobacteria as promising objects of modern biotechnology (Review) / Doronina N.V. [et al] // Applied Biochemistry and Microbiology. 2015. Vol. 51. № 2. P. 125–134.
- Троценко Ю.А., Доронина Н.В., Торгонская М.Л. Аэробные метиловобактерии / Ред. В.Ф. Гальченко. Пушино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2010. 325 с.
- Доронина Н.В., Кудинова Л.В., Троценко Ю.А. *Methylovorus mays* – новый вид аэробных облигатных метиловобактерий, ассоциированных с растениями // Микробиология. 2000. Т. 69. № 5. С. 712–716.
- Моделирование биодegradации метана / Казаков Д.А. [и др.] // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2008. Т. 150, кн. 3. С. 91–97.
- Троценко Ю.А., Доронина Н.В., Хмеленина В.Н., Понаморева О.Н. Биология и биотехнология аэробных метилотрофов: учебное пособие // Тула: Изд-во ТулГУ. 2010. 227 с.
- Кузнецова Т.А., Троценко Ю.А. Конструирование рекомбинантной плазмиды для экспрессии гена метанолдегидрогеназы // Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов: Всероссийский симпозиум с международным участием. Москва, МГУ им. М.В. Ломоносова. Биологический факультет. 24–27 декабря 2014 г.: Материалы. М.: Макс Пресс, 2014. С. 137.
- Гвоздев А.Р., Тухватуллин И.А., Гвоздев Р.И. Хиноновые алкогольдегидрогеназы и FAD-алкогольоксидазы // Биохимия. 2012. № 8. С. 1017–1032.
- BRENDA – The Comprehensive Enzyme Information System. URL: <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.1.2.7>
- The atomic resolution structure of methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* / Williams P.A. [et al] // Acta Cryst. 2005. V.61. P. 75–79.
- A systems biology approach uncovers cellular strategies used by *Methylobacterium extorquens* AM1 during the switch from multi- to single-carbon growth / Skovran E. [et al] // PLoS ONE. 2010 № 5: e14091. doi:10.1371/journal.pone.0014091.
- Effects of copper on wild and tolerant strains of the lichen *Photobionttrebouxiaerici* (Chlorophyta) and possible tolerance mechanisms / Backor M. [et al] // Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 2003. V. 45. P. 159–167.
- Faixová Z., Faix Š. Influence of metal ions on ruminal enzyme activities // Acta Veterinaria Brno. 2002. V. 71. P. 451–455.
- Purification and properties of methanol dehydrogenase from *Methylosinus* sp. WI 14 / Grosse S. [et al] // J. Basic Microbiol. 1998. V. 38. № 3. P. 189–196.