

## АЭРОБНЫЕ МЕТИЛОБАКТЕРИИ КАК ОСНОВА БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ ДЛЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА

Т.А. Кузнецова

Тульский государственный университет, Тула, Россия

Благодаря способности метилотрофных бактерий утилизировать метанол и другие восстановленные  $C_1$  – соединения, мембранной локализации основных ферментов и другим физиолого-биохимическим особенностям, данные клетки представляют особый биотехнологический интерес [1, 2] и являются удобным объектом для изучения закономерностей окисления субстратов в присутствии медиаторов электронного транспорта в биоэлектрохимических системах. Уже изученные генетические и биохимические основы метаболизма метилотрофов, описанные механизмы и структура основного фермента первичного  $C_1$ -метаболизма – PQQ-метанодегидрогеназы (МДГ) [3,4], создают необходимую научную основу для получения достоверных результатов новых исследований этой области.

Клетки метилобактерий, их бесклеточный экстракт, фермент МДГ могут являться основой при создании биосенсорных систем мониторинга  $C_1$  – соединений в природных и антропогенно загрязненных экосистемах. Исследование закономерностей процессов, происходящих в биосенсорах на основе клеток метилобактерий, их ферментных фракций, фермента МДГ и медиаторов электронного транспорта является актуальной задачей аналитической биотехнологии и позволит разработать фундаментальные основы для создания новых биосенсорных систем. В данной статье я привожу краткий обзор результатов своей работы по изучению биокаталитических свойств клеток и ферментов метилобактерий.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе проводила исследования с целыми клетками метилобактерий с разными путями первичной  $C_1$ -ассимиляции: *Methylovorus mayis* (РМФ – цикл), *Methylobacterium mesophilicum* и *Methylobacterium dichloromethanicum*, *Methylobacterium nodulans* *Methylobacterium extorquens* (дикого и рекомбинантного штаммов (сериновый цикл).

На начальном этапе работы в период выбора биокатализаторов были определены физиологические параметры роста метилобактерий и изучена метаболическая активность по скорости потребления метанола. Показано превосходство метилобактерий с РМФ-циклом над бактериями с сериновым циклом по скорости роста, продуктивности и выходу биомассы. Наиболее эффективным деструктором метанола является *Methylovorus mayis*, который характеризуется максимальными показателями: удельной скорости роста –  $0,33 \pm 0,02$  ч<sup>-1</sup>; выхода биомассы –  $14 \pm 2$  г/л; метаболическим и экономическим коэффициентами –  $8,33 \cdot 10^{-5}$  и  $6,25$ , соответственно, а также скоростью потребления метанола  $v = 0,018$  % об.·ч<sup>-1</sup>.

Для изучения свойств биокатализаторов в работе оценивалась их каталитическая активность по отношению к различным субстратам с помощью амперометрического преобразователя – гальванопотенциостата «IPС2000» («Вольта», Россия), интегрированного с ПК. В качестве биоматериала использовали целые клетки, бесклеточный экстракт и выделенный фермент МДГ.

*Целые клетки метилобактерий как биокатализаторы амперометрического медиаторного биосенсора.*

Для получения биокатализаторов с максимальной активностью на начальном этапе работы с каждым штаммом метилобактерий проводили изучение его биокаталитической активности в зависимости от фазы роста. Установлено, что исследуемые метилобактерии проявляют максимальную биоэлектрохимическую активность в фазе экспоненциального роста. Исходя из полученных результатов, для дальнейшего изучения взаимодействия ферментных систем метилобактерий с искусственными акцепторами электронов использовали клетки, собранные в экспоненциальной фазе роста.

Для прогнозирования биокаталитических свойств рекомбинантного фермента, штамм *Mb. extorquens* pCM160/mxaF\_Mext, полученный нами [5] использовали в качестве биокатализатора амперометрического медиаторного биосенсора. Для сравнения результатов использовали дикий

штамм аэробных метилотрофных бактерий из коллекции лаборатории метилотрофии ИБФМ РАН: *Mb. extorquens* AM1.

Сравнение биокаталитических свойств метиловых бактерий *Mb. extorquens* дикого и рекомбинантного штаммов проводили в условиях функционирования амперометрического медиаторного биосенсора с использованием ферроцена в качестве медиатора.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

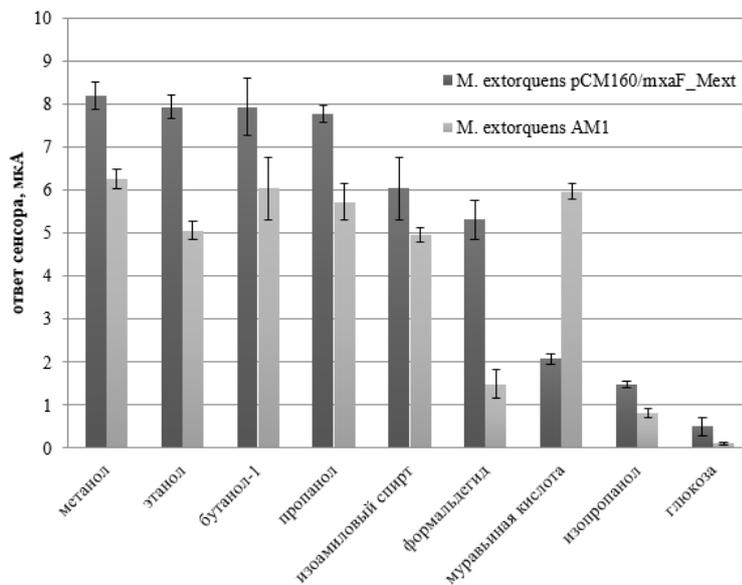


Рисунок 1. – Профиль субстратной специфичности клеток метиловых бактерий в присутствии ферроцена

применяться для определения содержания метанола в стоках.

Основным недостатком целых клеток метиловых бактерий как биокатализаторов является их недостаточная стабильность и подверженность внешним факторам (низкая стабильность микробного сенсора может быть обусловлена негативным действием ферроцена на клетки метиловых бактерий). Для того чтобы снизить роль физиологических аспектов функционирования живых клеток и использовать только каталитическую активность ферментных систем метиловых бактерий при разработке биосенсоров в качестве биокатализатора использовали клеточные структуры метиловых бактерий.

*Клеточные структуры метиловых бактерий как биокатализаторы амперометрического медиаторного биосенсора.*

Клетки метиловых бактерий, выращенные до экспоненциальной фазы роста, разрушали ультразвуком и подвергали дифференциальному центрифугированию. 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.

Наиболее интересные результаты были получены для мембранных фракций *Mb. dichloromethanicum*. Показано, что они в условиях биоэлектрохимического окисления субстратов в присутствии ферроцена специфичны к формальдегиду, что отличает эти бактерии от других, исследованных в работе, и является отправной точкой для новых исследований по выяснению молекулярных механизмов окисления формальдегида этими бактериями.

*Нативный и рекомбинантный фермент метанолдегидрогеназа как биокатализатор амперометрического медиаторного биосенсора.*

Нативная МДГ из *Mb. nodulans* была очищена до электрофоретически гомогенного состояния и охарактеризована. Схема очистки представляла собой многостадийную процедуру, включающую ионообменную хроматографию на анионите ДЭАЭ-сефарозе, хроматографию на геле гидроксипатита, катионообменную хроматографию и ультрафильтрацию.

Молекулярная масса нативного белка по результатам гель-фильтрации составляла около 70 кДа и состояла из большой – 60 кДа и малой – 6 кДа субъединиц судя по результатам электрофореза в присутствии SDS. Очищенный белок имел спектр идентичный с PQQ – МДГ, рН – оптимум при рН 9 – 10, фермент был неактивным в отсутствие активатора – аммония или метиламина, проявлял широкую субстратную специфичность, имея наибольшее сродство к метанолу, но не окислял вторичные спирты. Кажущиеся значения  $K_M$  к спиртам увеличивались с ростом углеродной цепи Фермент был иммобилизован на поверхность графитово-пастового электрода, модифицированного медиатором электронного транспорта – ферроценом. Относительное стандартное отклонение для 15 последовательных измерений – 7,6 %. Линейный диапазон определяемых концентраций метанола 0,0135 – 0,5 мМ, предел обнаружения – 4,5 мкМ, длительность единичного измерения – 10 мин; при хранении электрода при 4°C в течение 20 суток сохранялось 75 % активности иммобилизованного фермента. Показано, с помощью увеличения концентрации цианида калия в кювете можно повысить селективность определения метанола в присутствии формальдегида.

Поскольку очистка нативного фермента представляет собой достаточно трудоемкую и длительную процедуру – следующим этапом работы являлось получение рекомбинантной МДГ. В работе использовали рекомбинантный штамм *метиллобактерий Mb. extorquens* рСМ160, сконструированный на основе дикого штамма *Mb. extorquens* АМ1 (Всероссийская коллекция микроорганизмов ИБФМ РАН им. Г.К. Скрыбина, г. Пущино). Рекомбинантный штамм, содержит ген большой субъединицы МДГ – *mxaF*, клонированный в векторе рСМ160. Рекомбинантный белок был очищен аффинной металл-хелатной хроматографией на колонке с  $Ni^{2+}$ -NTA-агарозой до электрофоретически гомогенного состояния и охарактеризован. Методом SDS-электрофореза установлено, что рекомбинантная МДГ имеет субъединицу массой около 66 кДа. Определен спектр поглощения метанолдегидрогеназы, пик наблюдается при длине волны 345 нм, что свидетельствует о присутствии восстановленной формы кофермента PQQ в растворе фермента. Измерена рН – стабильность метанолдегидрогеназы, наибольшая активность которой наблюдается в диапазоне рН 7–11, что согласуется с литературными данными. Измерение субстратной специфичности показало, что наибольшая активность рекомбинантной МДГ наблюдается на метанол. Также рекомбинантный белок хорошо окисляет первичные спирты и формальдегид. Значение  $K_M$  к метанолу составило 0,36±0,07 мМ.

Показано, что рекомбинантный фермент МДГ является эффективным биокатализатором амперометрического медиаторного графитово-пастового сенсора. Ранее предложенный метод модификации графитовой пасты с помощью ГА [6] также обеспечивает высокие каталитические токи окисления метанола и увеличение стабильности биосенсора на основе рекомбинантной МДГ. Модифицированный амперометрический МДГ-биосенсор, будучи экономичным и простым в изготовлении, не уступает, а по некоторым аналитическим и метрологическим характеристикам превосходит другие биосенсоры для определения содержания метанола [7, 8]. Таким образом, основным преимуществом рекомбинантного фермента является легкость его получения: одностадийная очистка более экономична, что является особенно важным при создании расходных материалов для биосенсорного анализа.

**Работа выполнена при финансовой поддержке проекта государственного задания МИНОБРНАУКИ (FEWG-2020-008 «Направленное формирование нано/био интерфейсов с переносом заряда в биоэлектрохимических системах»)**

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Aerobic methylobacteria as promising objects of modern biotech-nology (Review) / N.V. Doronina, M.L. Torgonskaya, D.N. Fedorov [et al] // Applied Biochemistry and Microbiology. 2015. Vol. 51. № 2. P. 125–134.
2. Synthetic methylotrophy: A practical solution for methanol-based biomanufacturing / Y. Wang, L. Fan, P. Tuyishime[et al] // Trends in Biotechnology. 2020. V 38. № 6. P. 650–666.
3. Anthony C., Williams P. The structure and mechanism of methanol dehydrogenase // Biochim. Biophys. Acta. 2003. V. 1647. P. 18–23.
4. The crystal structure of methanol dehydrogenase, a quinoprotein from the marine methylotrophic bacterium *Methylobacterium sulfidovorans* MP / T.P. Cao, J.M. Choi, S.W. Kim [et al] // J Microbiol. 2018. V. 56. № 4. P. 246–254.
5. Кузнецова Т.А.. Конструирование рекомбинантной плазмиды для экспрессии гена метанолдегидрогеназы // Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов: сб. т. конф.. М.: Макс Пресс, 2014. С. 137.
6. Свойства модифицированных амперометрических биосенсоров на основе метанолдегидрогеназы и клеток *Methylobacterium nodulans* / Кузнецова Т.А. [и др.] // Прикл. биохим. микробиол. 2013. Т. 49. № 6. С. 613–618.
7. Электрохимический сенсор на основе алкогольоксидазы для экспресс-определения содержания низших спиртов / Алферов В.А. [и др.] // Журн. аналит. химии. 2011. Т. 66. № 12. С. 1322–1329.
8. Gülce H. A new amperometric enzyme electrode for alcohol determination // Biosens. Bioelectron. 2002. V. 17. № 6–7. P. 517–521.