

## ИЗУЧЕНИЕ ТЕРМИЧЕСКОЙ И ОПЕРАЦИОННОЙ СТАБИЛЬНОСТИ КЛЕТОЧНОЙ И ВНЕКЛЕТОЧНОЙ КАТАЛАЗ МЕТИЛОТРОФНОЙ БАКТЕРИИ *METHYLOPHILUS QUAYLEI*

А.Б. Пшеничникова<sup>1</sup>, М.А. Климович<sup>2</sup>

<sup>1</sup> МИРЭА – Российский технологический университет, Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова, Москва, Россия

Пероксид водорода  $H_2O_2$  широко применяется в текстильной, целлюлозно-бумажной, пищевой и фармацевтической промышленности, в химии, медицине, биоэлектронике и других важных областях. В связи с этим возникает задача удалять остаточные количества пероксида водорода, обладающего высокой мутагенной активностью. Для этого все чаще применяют фермент каталазу (КФ 1.11.1.6). Наиболее доступны для этих целей каталазы микроорганизмов, например, грибов. Однако мицелиальные грибы отличаются невысокими скоростями роста и потребностью в углеводных субстратах. Альтернативой грибным продуцентам могут служить метилотрофные бактерии, использующие в качестве единственного источника углерода и энергии метанол. Этот субстрат является доступным, возобновляемым и энергетически выгодным. Ранее нами было показано, что в клетках облигатной метилотрофной бактерии *Methylophilus quaylei* в условиях стресса повышается активность каталазы [1]. Целью настоящей работы было определение каталазной активности в клеточных экстрактах и в бесклеточной культуральной жидкости (БКЖ) бактерии *Methylophilus quaylei* при различной температуре и концентрации субстрата.

Аэробные метилотрофные бактерии *Methylophilus quaylei* (ВКМ В-2338) культивировали в синтетической среде с 1 % об. метанола при 30° С, pH 7 и затем центрифугировали, получая биомассу и БКЖ. Для получения клеточных экстрактов биомассу разрушали ультразвуком в 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,0 при 0° С. В клеточном экстракте и БКЖ определяли активность каталазы. Активность каталазы измеряли по скорости разложения пероксида водорода, детектируемого спектрофотометрически при 235 нм. Активность выражали в мкмоль пероксида водорода в 1 мин на 1 мг белка. Термическую инактивацию каталаз характеризовали эффективными константами скорости первого порядка  $k_{ин}$ ,  $c^{-1}$ , которые определяли по графикам « $\ln k_{ин}$  – время термической обработки образцов». Операционную стабильность фермента определяли как эффективную константу скорости инактивации каталазы,  $c^{-1}$ . Для этого строили линейные анаморфозы кинетических кривых разложения  $H_2O_2$  в координатах « $1/\ln([H_2O_2]_0/[H_2O_2]_t) - 1/t$ », где  $t$  – время.

Сравнительное исследование характеристик каталаз в клеточных экстрактах и БКЖ показало, что внутри и вне клеток проявляют активность разные формы фермента. Удельная активность внутриклеточного фермента составила 0,46, а внеклеточного – 2,8 мкМ / мин · мг белка, то есть в 6 раз больше. Эти формы фермента различаются и сродством к субстрату – константа Михаэлиса составила 13,5 мМ для внутриклеточного фермента и 5 мМ – для внеклеточного.

Константы скорости инактивации внутри- и внеклеточных каталаз  $k_{ин}$ , при 45° С составили  $0,27 \times 10^3 c^{-1}$  и  $0,006 \times 10^{-3} c^{-1}$ , а при 60° С внутриклеточный фермент был не активен, тогда как фермент в БКЖ имел  $k_{ин} 0,067 \times 10^{-3} c^{-1}$ . Следовательно, внеклеточная каталаза проявила более высокую термическую стабильность. Операционная стабильность при начальной концентрации пероксида водорода 15 мМ для обеих форм каталаз оказалась близкой –  $8,4 \times 10^{-3} c^{-1}$  для внутриклеточного фермента и  $7,0 \times 10^{-3} c^{-1}$  для внеклеточного.

Таким образом, у метилотрофной бактерии *Methylophilus quaylei* были обнаружены две формы каталазы – внутриклеточная и внеклеточная, последняя имеет более высокую каталитическую активность, термостабильность и сродство к субстрату пероксиду водорода.

### Литература

1. Нево А.Н.С., Пшеничникова А.Б., Складнев Д.А., Швеи В.И. Оксид дейтерия как стрессовый фактор у метилотрофных бактерий *Methylophilus* sp. Микробиология. 2004. Т. 73. № 2. С. 175–179.