

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Тульский государственный университет»

Институт Естественнонаучный
(наименование института)
Кафедра Химии
(наименование выпускающей кафедры)

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ
РАБОТА**

Направление подготовки 04.03.01

Химия

Характеристика свойств метанолдегидрогеназы из бесклеточного
экстракта метиловых бактерий *M.extorquens* pCM160

Студент группы 420461 _____ Баклагина С.П.
(подпись, дата) (фамилия,
инициалы)

Руководитель работы _____ Кузнецова Т.А.
(подпись, дата) (фамилия,
инициалы)

Заведующий кафедрой _____ к.х.н., проф. Алферов В.В.
(подпись, дата) (фамилия,
инициалы)

Тула, 2020 год

Оглавление

1. Введение.....	4
2. Литературный обзор.....	6
2.1. Общая характеристика метилотрофных бактерий.....	6
2.2. Структура фермента МДГ и механизм его взаимодействия с субстратом метанолом.....	8
2.3. Рост <i>M.extorquens</i> pCM160 на многоуглеродистых субстратах.....	13
2.4. Кинетика ферментативных реакций.....	15
2.5. Активность ферментов и методы ее определения.....	21
2.6. Методы определения активности ферментов:.....	21
2.6.1. Методы определения активности дегидрогеназ.....	23
2.7. Характеристики фермента.....	25
2.8. Заключение.....	30
3. Экспериментальная часть.....	31
3.1. Объект исследования.....	31
3.2. Культивирование метилотрофных бактерий.....	31
3.3. Определение активности фермента.....	32
3.4. Количественное определение белка по методу Лоури.....	33
4. Обсуждение результатов.....	35
4.1. Культивирование биомассы метиловых бактерий <i>M.extorquens</i> pCM160.....	35
4.2. Количественное определение содержания белка.....	35
4.2.1. Определение активности фермента МДГ в бесклеточном экстракте <i>M.extorquens</i> pCM160.....	36
4.3. Характеристики фермента МДГ в бесклеточном экстракте <i>M.extorquens</i> pCM160.....	38
4.3.1. Активация фермента МДГ.....	38
4.3.2. Определение субстратной специфичности фермента МДГ в бесклеточном экстракте <i>M.extorquens</i> pCM160.....	41

4.3.3.Определение кинетических параметров фермента МДГ в бесклеточном экстракте <i>M.extorquens</i> pCM160 по отношению к различным субстратам.....	44
4.3.4.Влияние солей металлов на активность фермента МДГ в бесклеточном экстракте <i>M.extorquens</i> pCM160.....	46
4.3.5.Стабильность фермента в бесклеточном экстракте <i>M.extorquens</i> pCM160 при различных условиях хранения.....	48
4.3.6.pH стабильность фермента МДГ в бесклеточном экстракте <i>M.extorquens</i> pCM160.....	50
4.4.Суммарная таблица по рассмотренным характеристикам.....	53
Выводы.....	54
Список использованной литературы.....	55
Приложения.....	60

1. Введение

Микроорганизмы представляют особый интерес в современной биотехнологии, так как способны использовать метан и метанол для синтеза полезных продуктов, таких как кормовой белок, пигменты, препараты гомологичных ферментов, рекомбинантные белки, компоненты электронно-транспортной цепи, витамины, коферменты, аминокислоты [1]. Такими микроорганизмами являются метилотрофы, способные использовать окисленные и восстановленные соединения C_1 , такие как метан, метанол, метиламин и другие, в качестве единственного источника углерода и энергии [2]. Род *Methylobacterium* является одним из наиболее распространенных и играет важную роль в научных исследованиях, в частности, для мониторинга уровня токсичных соединений C_1 и их последующей биоремедиации [3].

Клетки этих бактерий характеризуются высокой концентрацией периплазматических дегидрогеназ, основной из которых является метанолдегидрогеназа (МДГ) - фермент, катализирующий окисление метанола до формальдегида, а также способный окислять первичные спирты и альдегиды, используя искусственные акцепторы электронов.

В этом году было обнаружено, что многие бактерии, содержащие фермент МДГ, используют в своих активных центрах лантаноиды. Это открытие привело к появлению совершенно новой области исследований - лантаноид-зависимого бактериального метаболизма и биохимии [42]. Поэтому для получения воспроизводимых результатов в данной области исследования, необходим правильный подбор характеристических свойств МДГ. К таким показателям относятся кинетические характеристики фермента, субстратная специфичность МДГ к тому или иному субстрату, определенный диапазон pH, условия хранения биомассы, влияние посторонних примесей в виде солей тяжелых металлов, то есть это условия, при несоблюдении которых может снизиться активность фермента.

В связи с этим, целью работы является характеристика свойств фермента МДГ в бесклеточном экстракте *Methylobacterium extorquens* pCM160.

Для выполнения поставленной цели поставлены следующие задачи:

- 1) Нарастить биомассу бактерий *Methylobacterium extorquens* pCM160 и получить бесклеточный экстракт для дальнейших исследований;
- 2) Определить субстратную специфичность и кинетические параметры, такие как константу Михаэлиса, максимальную скорость для фермента МДГ в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM160 по отношению к различным субстратам;
- 3) Определить влияние солей металлов на активность фермента МДГ в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM160;
- 4) Определить стабильность при хранении и pH-стабильность фермента МДГ в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM160.
- 5)

2. Литературный обзор

2.1. Общая характеристика метилотрофных бактерий

По способности утилизировать углерод метилотрофные бактерии подразделяются на две центровые таксономические подгруппы микроорганизмов – облигатные и факультативные метилотрофы [4]. Облигатные метилотрофы способны расти только на метане и C_1 -соединениях (кроме муравьиной кислоты). Факультативные метилотрофы способны расти на метаноле, метиламинах и некоторых полиуглеродных C_n -соединениях, но не на метане. Часто они растут на муравьиной кислоте и на небольшом числе простых C_2 - - C_4 - соединениях (таблица 1).

Таблица 1. Субстраты облигатных и факультативных метилотрофов

Субстраты		Облигатные метилотрофы (<i>Methylomonas</i>)	Факультативные метилотрофы (<i>Methylobacterium</i>)
C_1 -соединения	Метан	+	-
	Диметиловый эфир	+	-
	Метиловый эфир	+	+
	Муравьиная кислота	-	+
C_2 -соединения	Этиловый спирт	-	+
	Уксусная кислота	-	+
C_4 -соединения	β -оксимасляная кислота	-	+

Methylobacterium extorquens – аэробные розово-пигментированные факультативные метилотрофные α -протеобактерии, способные расти на широком спектре моноуглеродистых и многоуглеродистых субстратах, таких как метанол, метиламин, формиат, пируват и сукцинат [5]-[6]. Ассимиляция метанола до формальдегида происходит по сериновому циклу и служит основной модельной системой для изучения

метилотрофного метаболизма и метилотрофных ферментов [7]. Эти организмы являются заурядными обитателями экосистемы, поэтому замечены на многих образцах окружающей среды: на поверхности листьев и клубеньках, в рисовых зернах, на бобах также на других твердых поверхностях [8]-[11].

Поверхности листьев растений выделяют разнообразные источники углерода в малых количествах (мкМ), это в основном сахара и органические кислоты [12]-[13], и эти источники расположены неоднородно и являются результатом выщелачивания через кутикулу [14]. Так же через устьицы выделяются летучие углеродные субстраты, в частности побочный продукт метаболизма клеточной стенки растений - метанол. Пик выделения метанола возникает утром, когда открываются устьица, поэтому *Methylobacterium* должен быстро адаптироваться (метаболическая гибкость) к большим выбросам метанола для использования дополнительных источников углерода в течение остальной части дня, когда выбросы метанола низки, или в течение ночи, когда устьицы закрыты и метанол, следовательно, больше не доступен [15]. А также, предотвращая накопление его последующего токсического продукта окисления, формальдегида, а также других последующих токсичных метаболитов, таких как глиоксилат и глицин [16] - [17]. Таким образом, метанол, выделяющийся из пектина во время роста растений, является важным источником углерода для *Methylobacterium*, а поглощение ими других производных помогает поддерживать жизнестойкость растений.

Корректировка и равновесие между генерацией и потреблением токсичных продуктов метаболизма, связанных с высоким потоком токсических метаболитов, образующихся при метилотрофном росте, представляет собой занятное исследование метаболизма.

Процесс полного окисления метанола у метилотрофов может быть представлен в виде следующей схемы:

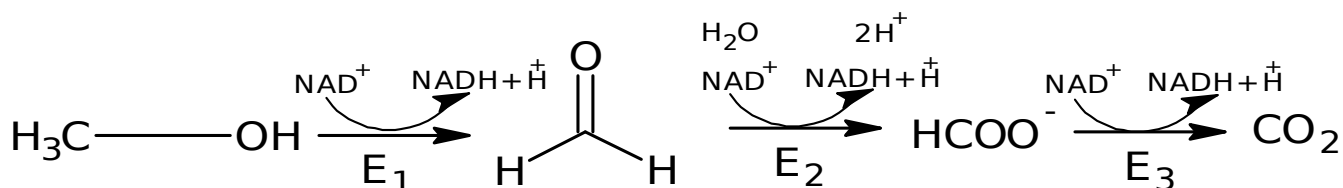


Рисунок 1. Ферментативное окисление метанола

Этапы ферментативного окисления метанола катализируются соответствующими дегидрогеназами: цитохром С (ЦитС) - зависимой МДГ (E_1), ЦитС - зависимой формальдегиддегидрогеназой (E_2) (либо ее роль выполняет МДГ) и NAD^+ - зависимой формиатгидрогеназой (E_3), различающиеся строением, природой акцепторов электронов и другими параметрами.

По месту поступления электронов в дыхательной цепи определяется энергетическая эффективность окисления C_1 -соединений соответствующими дегидрогеназами, которые похожи по составу переносчиков и их локализации на мембране для многих аэробных бактерий. В окислительном метаболизме C_1 -соединений участвуют NAD^+ , H^+ , флавины, хиноны, цитохромы а, b, с. Окисление метанола до формальдегида, катализируется ферментом метанолдегидрогеназой, содержащим в качестве простетической группы остаток пирролохинолинхинона (кофермент PQQ), иллюстрирующей передачей электронов в дыхательную цепь митохондрий на уровне цитохрома с. При этом синтезируется одна молекула АТФ [18].

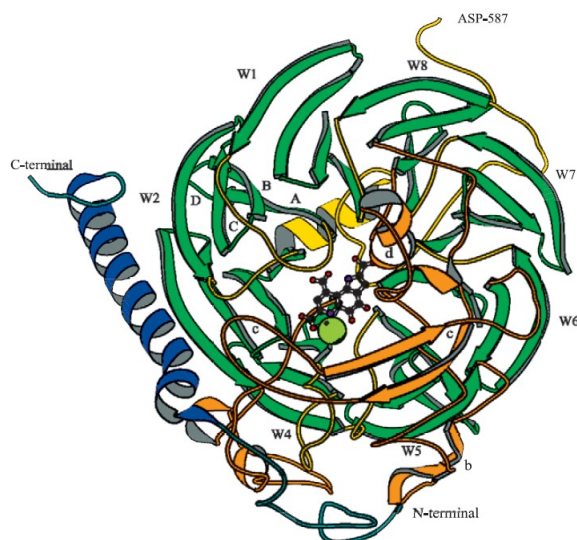
2.2. Структура фермента МДГ и механизм его взаимодействия с субстратом метанолом

Метанолдегидрогеназа (МДГ) – фермент, отвечающий за метаболизм молекул метанола и метана у метилотрофных бактерий. Это водорастворимый, периплазматический хинопротеин, признанный ключевым для обеспечения энергией для роста и развития метилотрофов. Данный фермент катализирует первую реакцию в периплазматической электронной транспортной цепи, отвечающей за окисление метанола в формальдегид.

Структура МДГ из *M.extorquens* pCM160 была определена с помощью дифракции рентгеновских лучей, таким образом фермент МДГ – тетрамерная структура, состоящая из двух α - и двух β -субъединиц, с молекулярными массами примерно 66 кДа и 8,5 кДа соответственно. β -субъединица очень мала, не встречается в других хинопротеинах и его функция пока неизвестна, но она обволакивает большую α -субъединицу, представленную в виде 8-лопастной «пропеллерной» структуры, вокруг которой расположены аминокислоты. Молекула PQQ зажата между индольным кольцом копланарного остатка триптофана и необычной дисульфидной кольцевой структурой, образованной из остатков цистеина (Cys₁₀₃, Cys₁₀₄), соединенных нетипичной неплоской пептидной связью (рисунок 2). Дисульфидное кольцо в активном центре МДГ не функционирует как окислительно-восстановительный компонент реакции и не имеет специальной функции в процессе включения ионов Ca²⁺ в активный центр. Предположительно оно участвует в стабилизации или защите свободно-радикальной семихионной формы протезной группы (PQQH) от растворителя на входе в активный центр [32].

Рисунок 2. Структура фермента МДГ

МДГ катализирует реакцию по механизму «пинг-понг» с последовательным восстановлением PQQ метанолом и выделением формальдегида, с последующими одноэлектронными переносами на



цитохром c_L, в ходе которых PQQH₂ окисляется обратно в хинон через стадию образования свободного феноксильного радикала. Лимитирующая стадия – разрушение метиловой связи C-H в метаноле, которое приводит к

большому изотопному эффекту дейтерия и именно на этот шаг влияет активация аммиаком. Аммоний (свободное основание) требуется при анализе фермента с системой искусственных акцепторов электронов [19], [39].

Первым шагом в механизме реакции будет отрыв протона от гидроксильной группы спирта и его присоединение к активному центру фермента, располагающемуся предположительно на Asp₃₀₃. Ион Ca²⁺, в механизме, представленном на рисунке 3, выступает в роли кислоты Льюиса благодаря своим координационным связям с кислородом на карбонильном атоме C₅ в молекуле PQQ, тем самым стабилизируя электрофильный атом C₅ для атаки оксианионом или гидрид-ионом. Помимо координационных связей с Ca²⁺, присутствие структуры аргинина (Arg₃₃₁) играет важную роль в повышении нуклеофильности атома C₅ соединения PQQ.

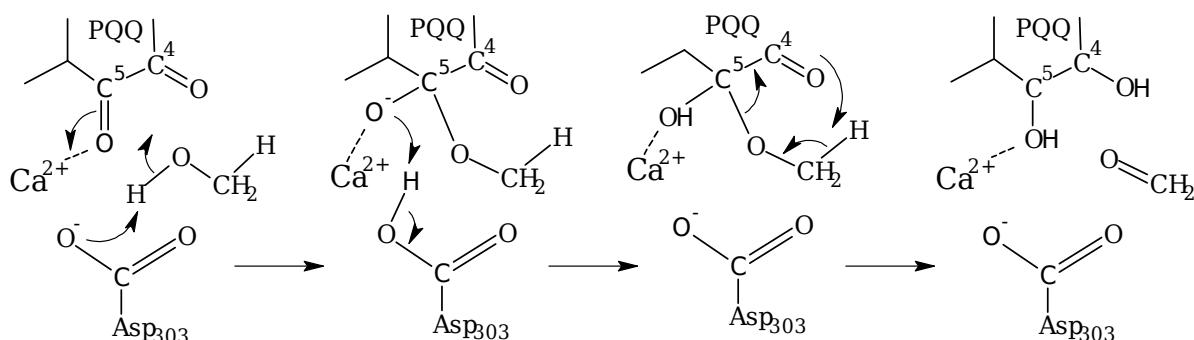


Рисунок 3. Механизм присоединения-отщепления, первоначально предложенный для взаимодействия фермента МДГ с метанолом

Карбонильный атом C₅ - очень реакционноспособен по отношению к нуклеофильным реагентам, что предполагает существование ковалентного комплекса PQQ - субстрат (гемикеталь) как участника механизма присоединения-отщепления (рисунок 3).

Возможна альтернативной версия первой стадии отщепления протона от спирта, но с последующим прямым переносом гидрида от метильной группы метанола на атом C₅ в молекуле PQQ (рисунок 4). Эта версия является наиболее доказанной, так как есть аналогичные реакции со схожими механизмами в хинопротеиндегидрогеназах, а именно в соединениях глюкозодегидрогеназе и алкогольдегидрогеназе.

Но стоит отметить, что исследования неэнзимной модели, в результате которых был предложен механизм присоединения-

отщепления, были проведены на примере соединения ацетонитрил (CH_3CN), поэтому данные результаты не могут быть стопроцентно сопоставимы с ферментативной моделью.

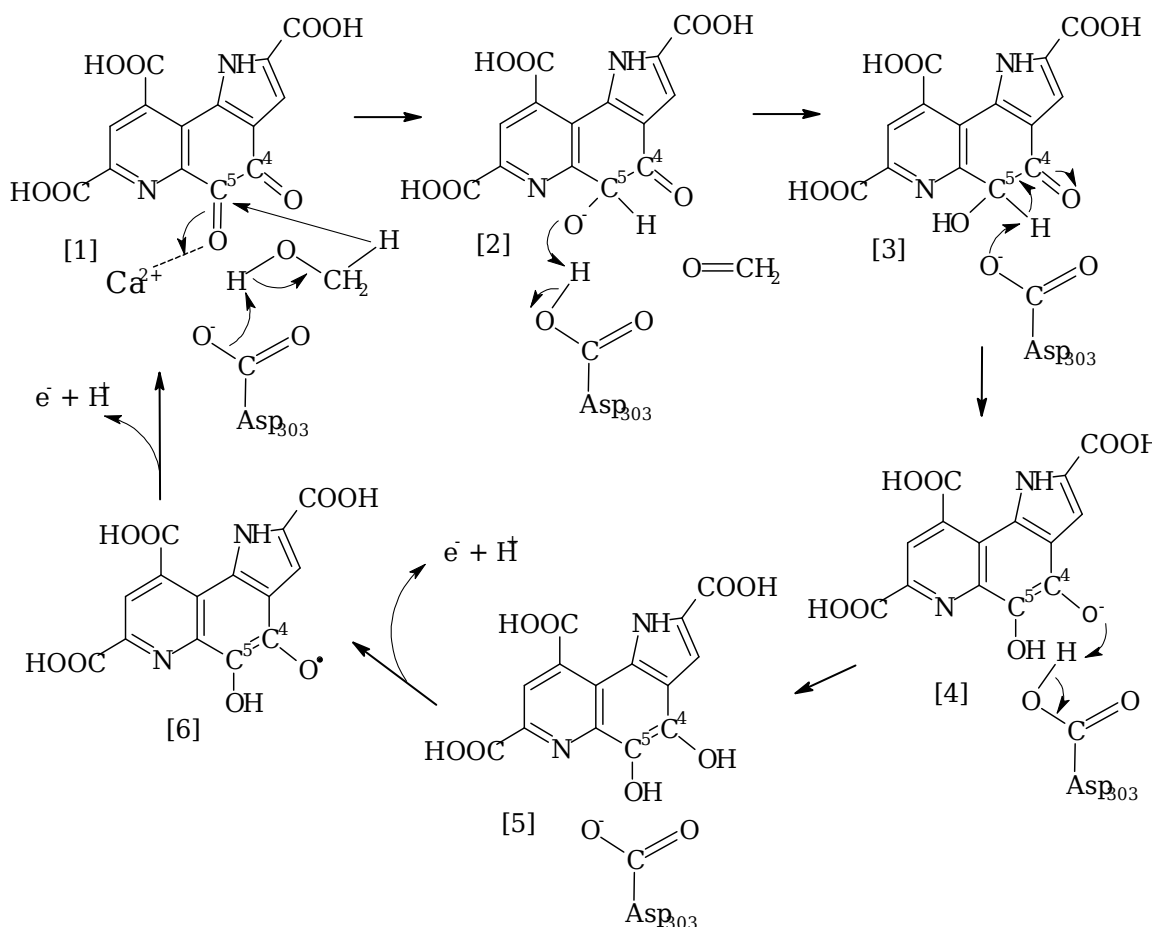


Рисунок 4. Механизм прямого и гидридного переноса для МДГ

В исследованиях МДГ (2003 года) была выделена структура PQQ, находящейся в восстановленной форме, причем атом C_5 содержит гидроксильную группу (структура [4] на рисунке 4), и аналогичная структура была получена из модифицированной МДГ, в которой аспарагиновая кислота (Asp_{303}) была заменена на глутаминовую (Glu_{303}). Ключевыми отличиями в данных структурах является новая координация иона Ca^{2+} с карбоксилатом аминокислотного остатка Glu_{303} ; образование новой водородной связи между атомом O_{E1} в молекуле Glu_{303} и атомом O_5 в молекуле PQQ; и устранение связи этого карбоксилата с остатками аминокислот Asn_{261} и Arg_{331} (рисунок 5). Структура модифицированной МДГ не согласуется с механизмом на рисунке 3, но соответствует механизму прямого переноса гидрида (рисунок 4)

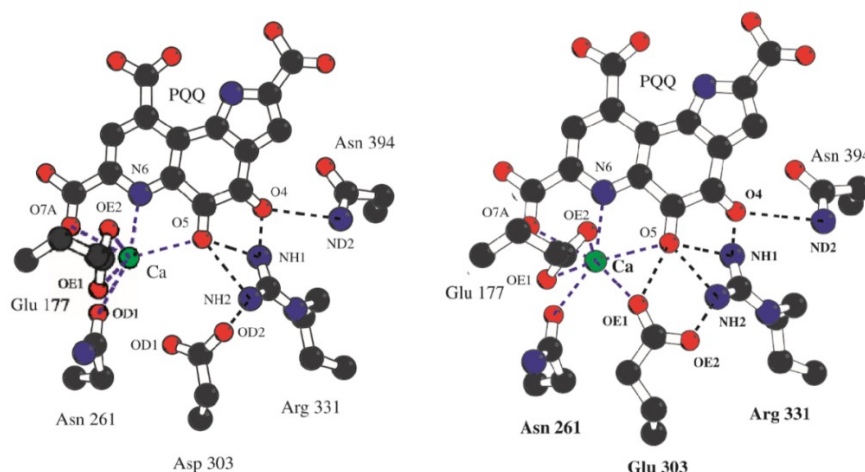


Рисунок 5. Структура нативной и модифицированной МДГ

Вопрос положения субстрата в активном центре фермента ещё остается открытым. Гидроксильная группа метанола должна быть расположена как можно ближе к боковой цепи Asp₃₀₃ (возможный активный центр), чтобы образовать с ней водородную связь, а метильная группа должна располагаться рядом с атомом C₅ в молекуле PQQ и внутри гидрофобной полости, ограниченной боковыми аминокислотными остатками из Trp₂₆₅, Trp₅₄₀ и Leu₅₅₆, а также дисульфидным кольцом. Ученые полагают, что по этой причине МДГ имеет широкую субстратную специфичность и может окислять широкий спектр первичных спиртов, имеющих достаточно длинный углеродный скелет. Однако причины того, как подобные субстраты могут получить доступ к активному центру, до сих пор не известны [20]- [21].

Учеными была выявлена каталитическая роль молекулы воды в активном центре фермента, а именно образование гидратированной формы продукта окисления метанола, протекающее по следующему принципу:

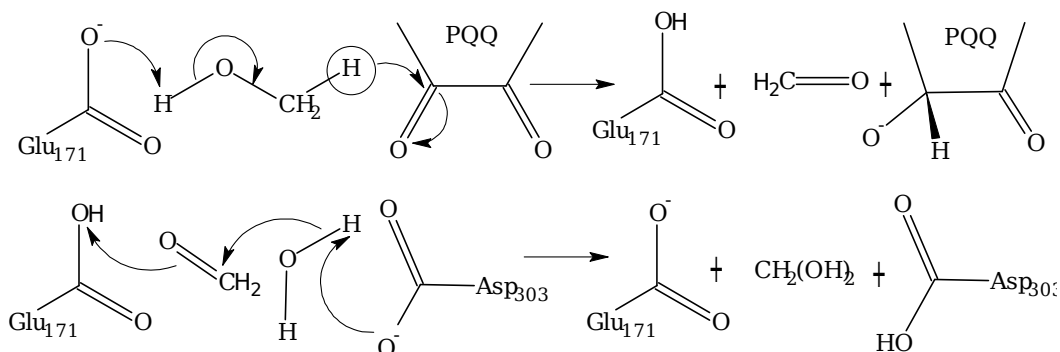


Рисунок 6. Участие молекулы воды в механизме прямого гидридного переноса

Таким образом, появляется вероятность неспецифического окисления гидратированной формы формальдегида.

2.3.Рост *M.extorquens* pCM160 на многоуглеродистых субстратах

Мало что известно о росте *M.extorquens* pCM160 на соединениях C₃-C₄ и о метаболизме многоуглеродных соединений после их образования из формальдегида через сериновый цикл, который является основным путем, посредством которого бактерии включают C₁ соединения из метанола в биомассу [6]. Эта неисследованная область гетеротрофного центрального метаболизма включает части цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), анаплевротические пути, глюконеогенез и пентозофосфатный путь (ПФП). Ферменты ЦТК присутствуют на более высоких уровнях в клетках, выращенных на многоуглеродных субстратах, чем в клетках, выращенных на субстратах C₁ [22]-[23]. Кроме того, мутанты 2-оксоглутаратдегидрогеназы [23] или пируватдегидрогеназы [24] были способны к росту на соединениях C₁, но не на многоуглеродистых соединениях, что указывает на специфичность этих реакций для гетеротрофии. Тем не менее, некоторые из мутантов были протекающими и активный центр мутации не был охарактеризован.

В связи с появлением инструментов для определения последовательности генома клеток *M.extorquens* pCM160 находят подход к пониманию метаболических путей в этом организме. Мутанты при росте на многоуглеродистых субстратах были получены и охарактеризованы, предоставляя начальную информацию о путях метаболизма C₃ и C₄ соединениях [25]: к ним относятся 2-оксоглутаратдегидрогеназа, пируватдегидрогеназа и NADH: убихиноноксидоредуктаза, которые, по прогнозам, не требуются для роста соединений C₁ соединений и глюкозо-6-фосфат-изомеразы, которая, по прогнозам, требуется для всех условий роста.

Убихиноноксидоредуктаза- это фермент, который является неотъемлемой частью энергетического обмена во время гетеротрофного роста и, следовательно, важен для понимания энергетического и

окислительно-восстановительного баланса клетки. Окисление NADH этим ферментным комплексом является первой стадией окислительного фосфорилирования и необходимо для преобразования восстановительной способности в форме NADH в энергию в виде АТФ. Метаболическая модель *M.extorquens* pCM160 предсказывает, что вступление NADH в окислительное фосфорилирование важно во время роста на сукцинате и пирувате, но не на метаноле [25]. Согласно модели, окисление метанола метанолдегидрогеназой [26] производит достаточно восстановленного цитохрома, который входит в цепь окислительного фосфорилирования ниже NADH, так что NAD(P)H является более ценным для клетки для биосинтетических потребностей, чем для производства энергии. Инсерционный мутант в предполагаемом гене NADH:убихиноноксидоредуктаза нормально рос на метаноле и демонстрировал нарушенный рост на сукцинате и пирувате [27].

Клетки, растущие на сукцинате, сохраняют значительную способность окислять метанол до формальдегида, а затем до формиата. В течение первого часа после перехода от сукцината к метанолу клетки выделяли около 1/3 общей продукции этих соединений в среду, в основном в форме формиата. Этот результат предполагает, что способность потреблять формиат изначально была меньше, чем способность производить формиат, но, превращая большую часть формальдегида в формиат и выделяя избыток, клетки могли пережить переход без накопления формальдегида до токсичных уровней. Вполне вероятно, что секреция служит буфером для пропускной способности этих промежуточных продуктов, позволяя клетке регулировать емкость потребления формиата в соответствии с потребностью, а не поддерживать высокую конститутивную способность. Поддерживая значительную способность окисления метанола в отсутствие субстрата, клетки могут использовать переходные источники метанола для получения энергии, не совершая значительных усилий по индукции всей системы метилотрофного метаболизма [6].

2.4. Кинетика ферментативных реакций

Кинетика ферментативных реакций – раздел биохимии, изучающий зависимость скорости химических реакций, катализируемых ферментами,

от химической природы реагирующих веществ, а также от факторов окружающей среды. Главной целью изучения кинетики ферментативных реакций является получение информации, которая может способствовать выяснению молекулярного механизма действия фермента.

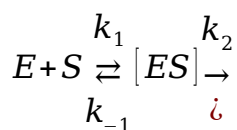
Для измерения каталитической активности ферментов используют такие показатели, как скорость реакции или активность фермента. Скорость ферментативной реакции – мера каталитической активности фермента и определяется изменением количества молекул субстрата или продукта за единицу времени, ее обозначают как активность фермента.

Рассмотрим факторы, влияющие на активность фермента:

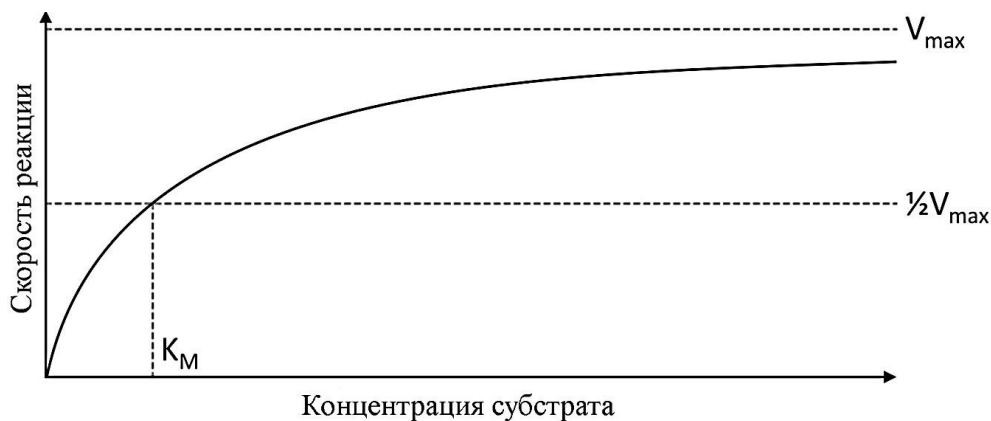
1. Концентрация субстрата: увеличение концентрации субстрата увеличивает скорость реакции, однако полное насыщение фермента ее ограничивает. График зависимости представляет собой гиперболу, которую можно разделить на 2 участка: 1 - линейная зависимость скорости от концентрации субстрата, 2 - скорость реакции не зависит от концентрации субстрата (рисунок 7).

Рисунок 7. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата

Ферментативная реакция обычно моделируется как двухэтапный процесс: обратимое образование промежуточного комплекса фермента (E) с реагирующим субстратом (S) и превращение этого комплекса в продукт реакции (P):



В равновесной модели Михаэлиса-Ментен образование фермент-



субстратного комплекса является наиболее быстрым процессом

относительно скорости его распада. Поэтому предполагается, что 1 стадия реакции будет равновесной. В момент времени t концентрация свободного фермента будет равна $[E_0] - [ES]$. Если концентрация субстрата гораздо больше, чем концентрация фермента, находящегося в составе фермент-субстратного комплекса, то содержанием субстрата в этом комплексе можно пренебречь. В этом случае скорость образования фермент-субстратного комплекса будет равна:

$$\frac{d[S]}{dt} = k_1[S] \times ([E_0] - [ES])$$

Наряду с образованием фермент-субстратного комплекса возможна его диссоциация со скоростью k_{-1} на фермент и исходный субстрат, а также распад с образованием продуктов реакции, протекающий со скоростью k_2 . Этот процесс описывается уравнением:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$$

В состоянии равновесия скорость образования комплекса и его распада равна, следовательно:

$$k_1[S] \times ([E_0] - [ES]) = [ES](k_{-1} + k_2)$$

После ряда упрощений получаем:

$$[ES] = \frac{[E_0] \times [S]}{[S] + (k_2 + k_{-1})/k_1}$$

Скорость реакции определяется как скорость распада фермент-субстратного комплекса (константа скорости k_2). Следовательно:

$$v = k_2 \times [ES]$$

Подставляя вместо $[ES]$ его значение, получаем:

$$v = \frac{k_2[E_0] \times [S]}{[S] + (k_2 + k_{-1})/k_1}$$

Упростить это уравнение можно следующим образом: обозначим $k_2[E_0]$ как V_{max} , т.е. скорость реакции в условиях, когда весь фермент занят субстратом, а $(k_2 + k_{-1})/k_1$ как константу Михаэлиса K_M . При подстановке этих величин получаем:

$$v = \frac{V_{max} \times [S]}{K_M + [S]}$$

Это уравнение является основным уравнением Михаэлиса-Ментен применительно к моносубстратным ферментативным реакциям. Это уравнение связывает между собой начальную скорость реакции, максимальную скорость реакции и исходную концентрацию субстрата (рисунок 6). В случае если начальная скорость реакции равна половине максимальной скорости реакции, уравнение принимает вид:

$$\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max} \times [S]}{K_M + [S]}$$

Разделив обе части уравнения на V_{max} , получаем:

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

Решая это уравнение относительно K_M , получаем, что K_M равно $[S]$. Следовательно, константа Михаэлиса численно равна такой концентрации субстрата, при которой скорость ферментативной реакции равна половине максимальной скорости.

Константа Михаэлиса имеет больше значение при исследовании ферментов; она является весьма важным параметром, характеризующим, в частности степень сродства фермента к субстрату.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

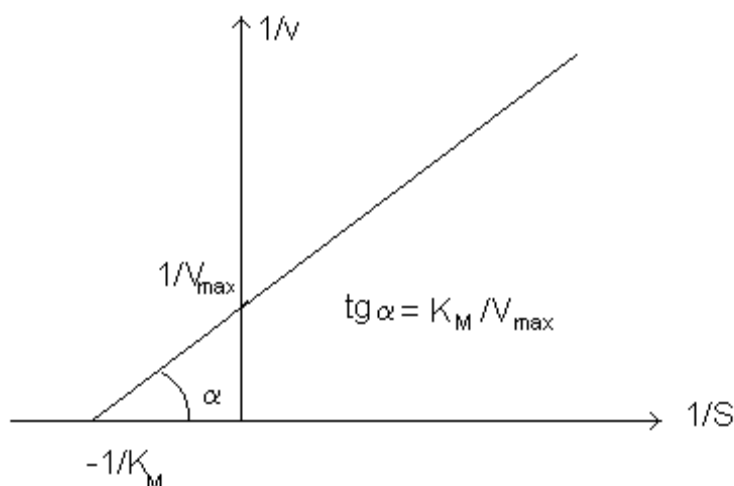


Рисунок 8. Определение константы Михаэлиса и максимальной скорости методом двойных обратных величин

Это линейное уравнение Лайнуивера-Бэрка, благодаря которому возможно определять в одном эксперименте константу Михаэлиса и максимальную скорость исследуемой ферментативной реакции [28].

V_{\max} и K_M – кинетические характеристики эффективности фермента. V_{\max} дает характеристику каталитической активности фермента и имеет размерность скорости ферментативной реакции моль/л, т.е. определяет максимальную возможность образования продукта при данной концентрации фермента в условиях избытка субстрата.

K_M характеризует сродство данного фермента к данному субстрату и является величиной постоянной, не зависящей от концентрации фермента. Чем меньше K_M , тем больше сродство фермента к данному субстрату, тем выше начальная скорость реакции [29].

2. Концентрация солей: большинство ферментов не могут существовать при высокой концентрации. Ионы разрушают гидратную оболочку белков, тем самым вызывая их осаждение. Типичные энзимы активны при концентрации солей 1-500 мМ.

3. Температура: в пределах физиологических условий зависимость скорости реакции от температуры подчиняется законам химической кинетики, т.е. описывается уравнением Аррениуса. Так при увеличении температуры тела с 36°C до 39°C скорость биохимических процессов в организме увеличивается в 1,2 – 1,4 раза.

Выше определенной температуры начинается тепловая денатурация белковых молекул в результате разрушения слабой ионной и водородной связи, стабилизирующей третичную структуру активного центра фермента, в том числе и ферментов, которые при этом теряют свою биологическую активность. Все ферменты работают в определенном интервале температур, специфичном для каждого организма. Для большинства ферментов, вовлеченных в односубстратную каталитическую реакцию, зависимость ее скорости от температуры описывается колоколообразной кривой (рисунок 9) [28].

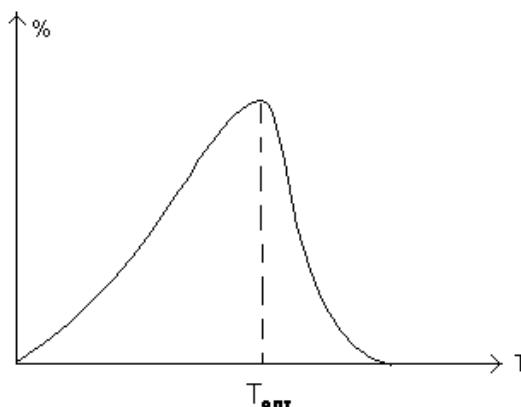


Рисунок 9. Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры

4. Влияние pH: Большинство ферментов характерным образом изменяют свою активность в зависимости от pH. Оптимальной активности соответствует определенная область pH, причем уменьшение и увеличение pH приводит к снижению активности (рисунок 10). Для различных реакций значения оптимума pH колеблются в широких пределах от сильно кислой среды (например, для пепсина) до сильно щелочной (например, для щелочной фосфатазы). Поэтому для работы с ферментами необходимо поддерживать pH с помощью соответствующего буфера. Зависимость ферментативной активности от pH определяется значением pK ионогенных групп белковой молекулы, особенно тех, которые находятся в активном центре молекулы или вблизи него (и, возможно, играют роль в связывании кофермента), а также групп, ответственных за изменение состояния активного центра путем конформационных изменений белковой молекулы. Кроме того, pH может влиять на степень ионизации или пространственную организацию субстрата.

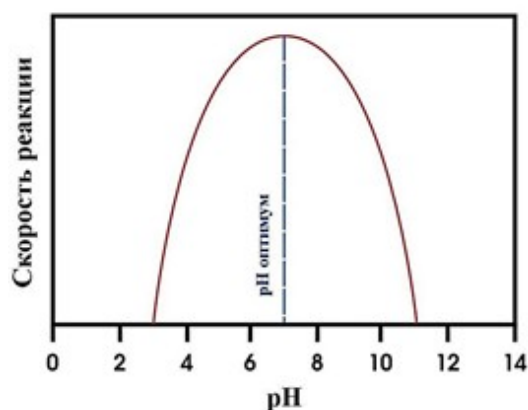


Рисунок 10. Зависимость скорости ферментативной реакции от pH

5. Влияние активаторов: активаторы - это молекулы или ионы, которые увеличивают активность ферментов. Часто в качестве активаторов выступают ионы металлов (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , K^{+}) и хлорид-ион (Cl^{-}). Механизм активации ферментов под действием этих ионов может быть разным:

- ионы являются коферментами и входят в состав активного центра;
- облегчают образование ES;
- облегчают присоединение кофермента к апоферменту;
- обеспечивают образование устойчивой четвертичной структуры белков.

6. Влияние ингибиторов: ингибиторы - вещества способные снижать скорость реакции, путем угнетения действия ферментов. Процесс действия ингибитора называется - ингибирование. Ингибирование бывает: необратимое, т. е. фермент полностью теряет свою активность, что связано с нарушением его структуры. Это вызывают сильные кислоты, щелочи, спирты, яды. Обратимое - происходит только в период непосредственного взаимодействия фермента и ингибитора, после удаления ингибитора активность фермента вновь возвращается. Обратимое ингибирование делится на конкурентное и неконкурентное. Конкурентное ингибирование наблюдается, когда ингибитор и субстрат имеют сходные структуры и конкурируют за связывание с активным центром фермента. Поскольку конкурентный ингибитор связывается обратимо с ферментом, то при увеличении концентрации субстрата увеличивается вероятность связывания фермента и субстрата, и ингибирование таким образом можно преодолеть. Неконкурентное ингибирование наблюдается, когда ингибитор и фермент не сходны по структуре и ингибитор присоединяется к регуляторному центру фермента. В данном типе ингибирования влияние ингибитора не может быть преодолено повышением концентрации субстрата.

2.5. Активность ферментов и методы ее определения

При проведении ферментативной реакции в условиях избытка субстрата скорость реакции будет зависеть от концентрации фермента.

Графическая зависимость такой реакции имеет вид прямой линии. Однако количество фермента часто невозможно определить в абсолютных величинах, поэтому на практике пользуются условными величинами, характеризующими активность фермента: одна международная единица активности (МЕ) соответствует такому количеству фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата за 1 минуту при оптимальных условиях проведения ферментативной реакции. Оптимальные условия индивидуальны для каждого фермента и зависят от температуры среды, pH раствора, при отсутствии активаторов и ингибиторов.

$$1 \text{ МЕ} = \frac{1 \text{ мкмоль превращенного субстрата}}{1 \text{ мин}}$$

Количество единиц активности nМЕ определяют по формуле:

$$n \text{ МЕ} = \frac{\text{количество превращенного субстрата (мкмоль)}}{\text{время (мин)}}$$

В медицинской и фармацевтической практике для оценки активности ферментов часто используют такое понятие, как удельная активность фермента, показывающее чистоту фермента, т.е. отсутствие посторонних белков. Удельная активность определяется как число единиц активности фермента, приходящихся на 1 мг белка [20].

$$\text{Уд. акт.} = \frac{\text{количество превращенного субстрата (мкмоль)}}{\text{время (мин)} \times \text{количество белка (мг)}}$$

2.6. Методы определения активности ферментов:

1. Спектральные методы:

- Фотометрический анализ в УФ-, видимой областях спектра (наиболее распространённым методом является фотометрический анализ в видимой области спектра, т.е. в интервале длин волн 400-780 нм), связана с применением химических методов для осуществления «цветных реакций», а также с применением окрашенных субстратов – определение белка, нуклеиновых кислот, фосфатов, липидов, сахаров;

- Флуориметрия (данный метод анализа использует разницу во флуоресценции субстрата и продукта для того, чтобы измерить флуоресценцию фермента. Он более чувствительный по сравнению со спектрофотометрическими методами, но менее универсальный).

- Люминометрия (очень чувствительный, основан на собственном свечении);

- Турбидиметрия (явление рассеяния света) при образовании суспензии субстратов или клеток;

2. Электрохимические методы:

- Титриметрический метод (рН-статирование, измерение изменения рН);

3. Вискозиметрические методы - основаны на уменьшении вязкости полимерных субстратов, в первую очередь полисахридов (карбогидразы), определение вязкости ферментационных сред;

4. Хроматографические методы: ТСХ, ЖХ, ВЭЖХ, белковая хроматография (данные методы могут потребовать использование большого количества материала, но их чувствительность может быть увеличена путем маркировки субстратов/продуктов радиоактивной или флуоресцентной меткой);

5. Электротранспортные методы:

- Электрофорез (в денатурирующих и неденатурирующих условиях)
- определение молекулярной массы белков и пептидов;

- Электрофокусирование - определение изоэлектрической точки белков (pI);

6. Масс-спектрометрические методы

7. Калориметрия (измерение теплоты, выделяющейся или поглощающейся при химических реакциях. Этот метод носит весьма общий характер, поскольку многие реакции связаны с изменениями температуры, а использование микрокалориметра не требуется большого количества фермента или субстрата. Калориметрию можно использовать в том случае, если активность невозможно измерить никаким другим способом) [30].

2.6.1. Методы определения активности дегидрогеназ

В условиях *in vitro* МДГ активна с искусственными акцепторами электронов, которые способны неферментативно соединяться с NADH или NADPH в присутствии промежуточного переносчика электронов - феназинметасульфата, к таким системам относятся:

- Йодонитротетразолийхлорид (ИНТ) – темно-желтый или кремовым порошок. Акцептор электронов. Окисленная форма бесцветна, восстановленная форма окрашена в красновато-пурпурый цвет. Легко восстанавливается флавопротеиновыми ферментами; скорость может возрастать в присутствии промежуточных переносчиков электронов, таких, как феназинметасульфат (ФМС). Не окисляется кислородом воздуха. Структурная формула представлена на рисунке 11.

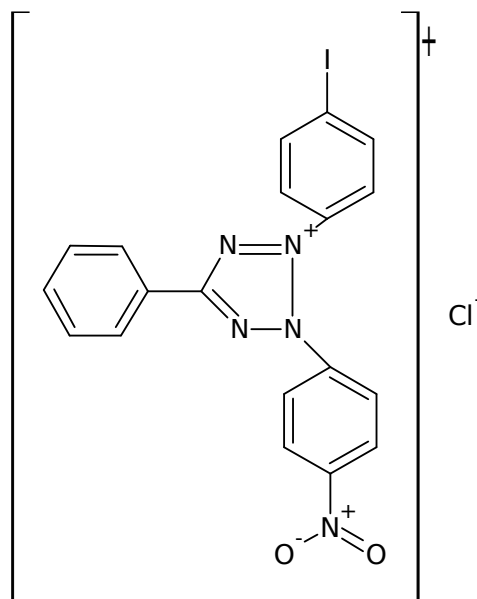


Рисунок 11. Структура йодонитротетразолийхлорида

- Тетразолиевый нитросиний (нитро ВТ)-акцептор электронов. Окисленная форма бесцветна, восстановленная форма бимформазан окрашена от синего до черного цвета. Легко восстанавливается флавопротеиновыми ферментами; скорость восстановления увеличивается в присутствии переносчиков электронов, таких, как феназинметасульфат (ФМС). Часто используется для определения дегидрогеназ методом электрофореза. Немного фотостабилен. Структурная формула представлена на рисунке 12.

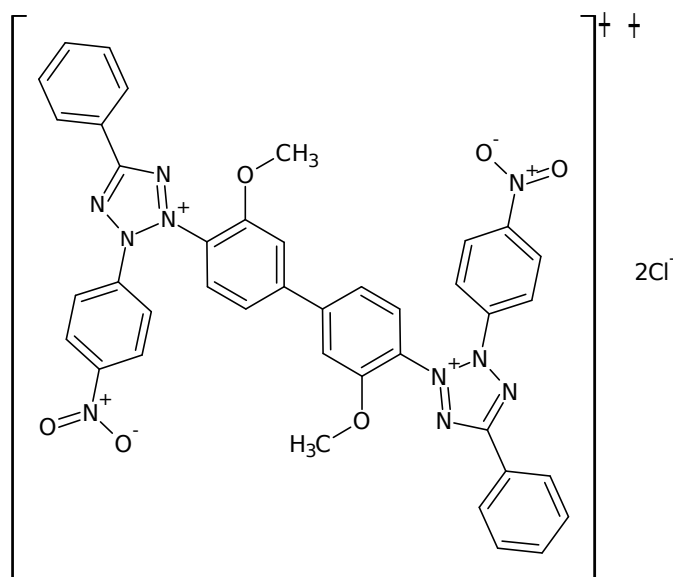


Рисунок 12. Структура тетразолиевого нитросинего

- 2,6-Дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ, DCPIP) – темно-зеленый порошок. Акцептор электронов. Окисленная форма при нейтральном pH имеет синюю окраску, при кислом – розовую. Восстанавливается флавопротеиновыми ферментами; скорость может возрастать в присутствии промежуточных переносчиков электронов, таких, как феназинметасульфат (ФМС). Окисленная форма очень медленно окисляется кислородом воздуха, поэтому нет необходимости удалять воздух. Часто используют в объемном анализе. Структурная формула представлена на рисунке 13.

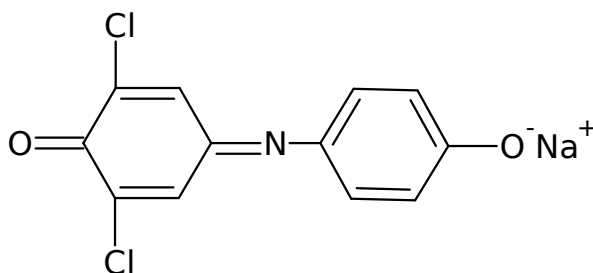


Рисунок 13. Структура 2,6-дихлорфенолиндофенола

- Феназинметасульфат (ФМС, PMS) – акцептор и переносчик электронов. Окисленная форма желтая, восстановленная бесцветная, семихинон иногда бывает зеленым. Быстро восстанавливается флавопротеиновыми ферментами, включая сукцинатдегидрогеназу. Восстановленное соединение легко окисляется кислородом, так что ФМС используется в реакциях определения активности ферментов как переносчик электронов между ферментами и кислородом, цитохромом с

или менее легко аутоокисляющимися акцепторами электронов, например, индофенолами или солями тетразолия. Восстановленное соединение (дигидрофеназинметасульфат) используют как донор электронов, например, для восстановления цитохрома с. Реагирует с -SH-соединениями, включая -SH-ферменты [31]. Структурная формула представлена на рисунке 14.

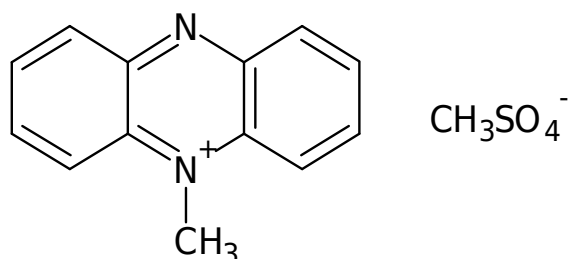


Рисунок 14. Структура феназинметасульфата

2.7. Характеристики фермента

С целью получения максимальной активности, разработки экспрессных методов выделения и наиболее эффективного использования ферментов проводят его характеристику. Полная характеристика включает изучение следующих параметров:

- Изучение замещение в активном центре одних ионов металлов на другие, связанное с наибольшим сродством того или иного катиона к ферменту, необходимое для каталитической активности;
- Влияние ингибиторов на активность;
- Влияние активаторов на активность;
- кинетические параметры: константа Михаэлиса-Ментен, удельная активность;
- рН оптимум и диапазон;
- температурный оптимум;
- изоэлектрическая точка;
- локализация фермента;
- молекулярный вес фермента;
- структура фермента;
- кристаллизация фермента;
- общая стабильность фермента;
- стабильность хранения для определенной концентрации фермента, при необходимой температуре, рН;

- очистка фермента;
- ренатурация фермента.

С помощью обширной информационной базы данных «BRENDA», построила таблицу стандартных характеристик фермента МДГ из различных микроорганизмов [38] (таблица 2):

Таблица 2. Стандартные характеристики фермента МДГ из различных микроорганизмов

Микроорганизм	Ко-фактор	Ингибитор	Активатор	K_m , мМ	Удельная активность, ед/мг белка	pH оптимум	Температура оптимум, °C	P_i	Субъединицы	Стабильность хранения, °C
<i>Methylobacterium extorquens</i> дикий	PQQ	Циклопропанол, ФМС, Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Li^+ , Mg^{2+} , KCN	NH_3 , CH_3NH_2 , NH_4^+ , NH_4Cl		5,4;6,12	7-10,5	20-25	8,8	α *62000, альфа-субъединица, + β *7500, бета-субъединица, SDS-PAGE; 2×66000+2×8500(тетрамер $\alpha_2\beta_2$); 4×66000(тетрамер)	-80°C, pH 7,0 (незначительная потеря активности через 6 месяцев); +4 °C, pH 7,0 (потеря 80% активности в течении 1 недели)
<i>Hyphomicrobium denitrificans</i>	PQQ		β -аланин, сложные эфиры глицина	0,0003 - 0,105	0,12	7-9	25		2×65000+2×9000 (тетрамер $\alpha_2\beta_2$)	
<i>Methylophaga aminisulfidivorans</i>	PQQ			0,013-0,1046	0,69-21,03	8	30	5,4-5,8	2*65980, субъединица альфа, +2*7580, субъединица бета, +	

									1*27860	
--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--

Продолжение таблицы 2

<i>Methylophilus methylotrophus</i>	PQQ		β-аланин, сложные эфиры глицина						2×62000,+2×8000 (тетрамер α2β2)	
<i>Methylophilus sp.</i>	PQQ		NH ₃			9				
<i>Methylosinus sp.</i>	PQQ	ФМС, Cu ²⁺ , Fe ²⁺ , Ca ²⁺ , Co ²⁺ , Li ⁺ , Mg ²⁺ , KCN	CH ₃ NH ₂ , NH ₄ ⁺	6,38 (бутанол) 3,58(этанол) 0,58(гетанол) 0,79(гексано л) 0,65(октанол) 1,34(пентано л) 3,69(пропано л) 0,45(метанол)	6,12	9	57		2×70000(димер)	-18 °С, рН 7,5 (потеря 10% активности через 1 месяц); +4°С, рН 7,5 (потеря 30% активности через 24 ч)
<i>Methylibium petroleiphilum</i>	ФМС, PQQ			0,01(этанол) 0,29(метанол) 0,01(н-бутанол) 0,09(н-пропанол)		7,5				

<i>Methyloversatilis universalis</i>	ФМС, РQQ		NH ₄ Cl	0,05(этанол) 0,01(метанол) 0,5(н-бутанол) 0,5(н-пропанол)		7,5	22			
--------------------------------------	-------------	--	--------------------	--------------------------------------------------------------------	--	-----	----	--	--	--

2.8. Заключение

Благодаря способности метилотрофных бактерий утилизировать метанол и другие восстановленные C_1 - соединения, данные клетки представляют особый биотехнологический интерес. Уже изученные генетические и биохимические основы метаболизма метилотрофов, описанные механизмы и структура основного фермента - МДГ, создают необходимую научную основу для получения достоверных результатов дальнейших исследований этой области.

Для характеристики свойств и описания кинетических параметров МДГ *in vitro*, быстрым, удобным, воспроизводимым является спектрофотометрический метод, описанный Энтони и Затманом 55 лет назад. В качестве красителей в этом методе используют систему акцепторов электронов ДХФИФ+ФМС, являющуюся универсальной и удобной для определения кинетических параметров и изучения других свойств фермента.

3.Экспериментальная часть

3.1.Объект исследования

В работе использовали клетки рекомбинантных метиловых бактерий *Methylobacterium extorquens* pCM160.

3.2.Культивирование метилотрофных бактерий

Метиловых бактерии выращивали на среде Канада («К») со следующим составом (таблица 3):

Таблица 3. Среда «К», pH =7,35

Вещество	Содержание, г/л
KH_2PO_4	2,0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,0
NaCl	0,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,125
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,002
Канамицин	0,05
Агар-агар (для агаризованной среды)	2% по объему
Субстрат (для агаризованной среды)	2% по объему
Субстрат (для жидкой среды)	0,5% по объему

Посев *M.extorquens* pCM160 на агаризованную среду проводили в стерильных условиях с предоставленных выращенных образцов с добавлением 2% субстрата (100% раствор CH_3OH) по объему среды и 0,05 г/л канамицина. Чашки помещали в термостат при температуре 28 °C и, после получения устойчивых колоний (4-5 сутки), производили посев на жидкую среду.

Культуры микроорганизмов выращивали в колбах объемом 750 мл в стерильных условиях с добавлением 0,5% субстрата (100% раствор CH_3OH) по объему среды и 0,05 г/л канамицина. Инокулят вносили в приблизительном количестве в размере 2,5 г/л. Выращивание проводили при 27 °C и аэрация на шейкере при 160 об/мин.

Биомассу отбирали на 7 сутки и выделяли бесклеточный экстракт.

Отобранные клетки, центрифугировали (5000 об/мин, 10 мин), дважды отмывали 0,05 М фосфатным буфером (pH=7,5) с последующим ресуспендированием в том же буфере. Клетки разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе MSE150 (Англия) при охлаждении льдом: 15 циклов по 10 секунд с интервалом 60 секунд. Для удаления клеточных стенок использовали центрифугирование.

3.3.Определение активности фермента

Активность МДГ определяли спектрофотометрически на спектрофотометре ПЭ-5400УФ (ЭКРОС, Россия), толщине кюветы 1 см за время 2 минуты ($\varepsilon = 1,9 \times 10^4 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$) при 30 °С по известной методике [33] с незначительной модификацией реакционной смеси. Анализируемая смесь содержала следующие компоненты (таблица 4):

Таблица 4. Состав смеси для определения активности МДГ

Реактивы		$C_{\text{исх}}$	$C_{\text{в кювете}}$	V, мл
Буфер	Трис-HCl	137 мМ	100 мМ	1,5
	NH ₄ Cl	0,6 М	15 мМ	0,05
	NaN ₃	80 мМ	2 мМ	0,05
Вода		-	-	0,2
ФМС		44 мМ	1,1 мМ	0,05
ДХФИФ		3,48 мМ	3 мМ	0,05
CH ₃ ОН		1 М	2,5 М	0,05
Экстракт		-	-	0,05

Смесь, содержащую буфер, нагретого до 30 °С, воду и метанол инкубировали в течение 5 мин., и затем добавляли охлажденные акцепторы электронов ДХФИФ и ФМС, и измеряли тангенс ферментативной реакции. Реакцию инициировали добавлением экстракта, активность МДГ определяли путем измерения уменьшения поглощения ДХФИФ при 600 нм за 1 мин., реакция проходит в пределах 15 - 45 сек. Расчет проводили по следующим формулам:

$$\text{Активность} \left(\frac{E\partial}{\text{мл}} \right) = \dots$$

$$\text{Уд. активность} (E\partial/\text{мг белка}) = (E\partial/\text{мл}) \times \frac{1}{C}$$

Где:

f - коэффициент разбавления исходного раствора препарата фермента;

19 – коэффициент миллимолярной экстинкции ДХФИФ кислоты при 600 нм, рН 9,0;

$V_{\text{образца}}$ – объем образца в мл;

C – концентрация белка в исходном растворе, мг/мл.

Значения удельной активности с доверительным интервалом рассчитывали по формуле [33]:

$$B \pm \Delta B = \frac{A}{C} \pm \left(\frac{A}{C} \times \left(\frac{\Delta A}{A} + \frac{\Delta C}{C} \right) \right)$$

Где B – удельная активность, Ед/мг белка;

ΔB – абсолютная погрешность удельной активности, Ед/мг белка;

A – активность, Ед/мл;

ΔA – абсолютная погрешность активности, Ед/мл;

C – исходная концентрация белка мг/мл;

ΔC – абсолютная погрешность исходной концентрации белка мг/мл.

За единицу активности принимали количество МДГ, которое катализирует за минуту превращение 1 мкмоль метанола в формальдегид при рН 9,0 и 30 °С.

Показатели активности, суммарной активности и удельной активности рассчитывали с помощью программы MS Excel 2010 и SigmaPlot 12.5.

Белок в экстракте определяли по методу Лоури, в качестве стандартного белка использовали раствор БСА.

3.4.Количественное определение белка по методу Лоури

Измерения проводили посредством построения градуировочного графика по стандартным растворам БСА (200 мкг/мл) (таблица 5). Перед определением смешивали 50 мл 2% раствора Na_2CO_3 в 0,1н растворе NaOH (реактив А) и 1 мл 0,5% раствора CuSO_4 в 1% растворе $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (реактив В), получив раствор С.

Таблица 5. Данные для построения градуировочного графика с растворами белка разной концентрации

№	Станд. Р-р БСА (200 мкг/мл), мл	Дистиллирован ная вода, мл	Конц. белка, мкг/мл	Содержание белка в пробе, мкг
1	0,05	0,95	10	10
2	0,20	0,80	50	50

3	0,50	0,50	100	100
4	0,80	0,20	160	160
5	1,00	-	200	200

Одновременно готовили пробирку с неизвестной концентрацией, разбавленной в 100 и в 50 раз. В каждую пробирку добавили по 5 мл приготовленного раствора С и через 10 минут добавили 0,5 мл реактива Фолина, разбавленного в 2 раза. Термостатировали при 37⁰С 30 минут для развития окраски.

Фотометрировали на спектрофотометре ПЭ-5400УФ (ЭКРОС, Россия) при длине волны 750 нм. По результатам измерения построили градуировочный график и определили содержание белка в каждой пробе [34].

4. Обсуждение результатов

4.1. Культивирование биомассы метиловых бактерий *M. extorquens* pCM160

В ходе эксперимента нами были выращены колонии *M. extorquens* pCM160 на агаризированной среде и затем пересажены на жидкую среду Канеда. Так как мы использовали рекомбинантный штамм бактерий, содержащий плазмиду устойчивости к канамицину, в среду добавляли данный антибиотик, для поддержания чистоты культуры. Выделение бесклеточного экстракта и определение активности содержащегося в нем фермента МДГ проводили на 7 сутки после посева. Данное время культивирования было выбрано на основании ранее сделанных опытов [40]-[41].

4.2. Количественное определение содержания белка

Определение концентрации белка проводили по методу Лоури. Построили градуировочный график (рисунок 15) в пределах концентраций от 10 до 200 мкг/мл (таблица 6).

Далее опытным путем подбирали разбавление анализируемого образца бесклеточного экстракта *M. extorquens* pCM160 неизвестной концентрации, чтобы содержание белка находилось в пределах концентраций градуировочного графика.

Таким образом, анализируемый образец был разбавлен в 100 раз.

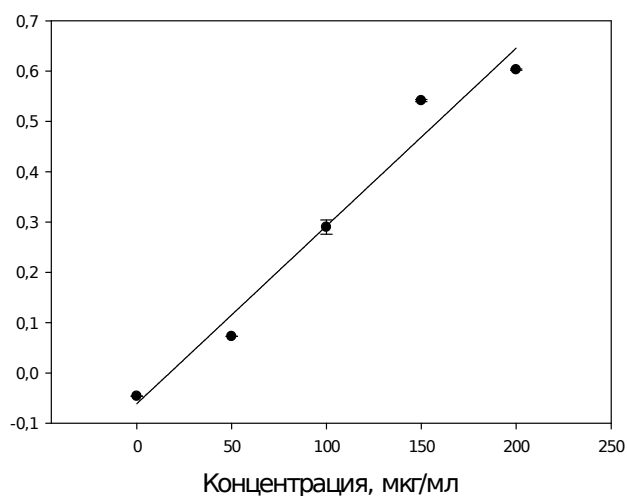


Рисунок 15. Градуировочная зависимость оптической плотности от концентрации белка

Градуировочное уравнение представлено в виде:

$$y = (0,0035 \pm 0,0002) x + (-0,0612 \pm 0,0263), R^2 = 0,9713$$

Таблица 6. Определение концентрации белка в анализируемом образце

№ пробы	Концентрация белка в кювете, мкг/мл	Исходная концентрация белка мг/мл	Суммарный белок, мг
1	110,4	11,04	78,4

Суммарную концентрацию белка определяли по формуле:

$$C_{\text{сумм. белка}} = C_{\text{исх. белка}} \times V$$

Где V – общий объем образца, мл.

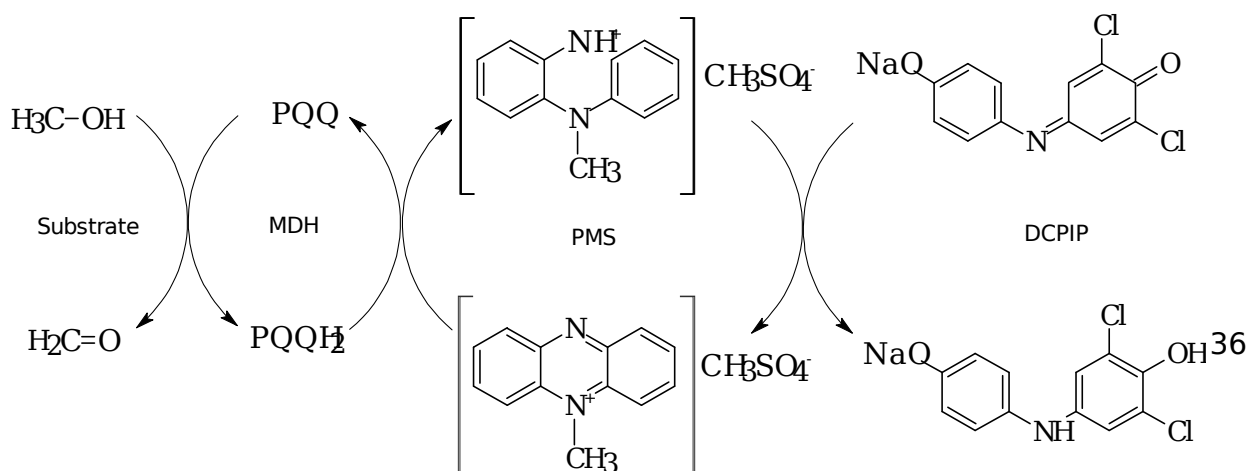
Полученные значения исходной концентрации белка были использованы для расчета активности фермента.

4.2.1. Определение активности фермента МДГ в бесклеточном экстракте *M. extorquens* pCM160

В клетках метиловых бактерий МДГ катализирует окисление метанола, передавая электроны на природный акцептор – цитохром c_L . Также известно, что *in vitro* МДГ проявляет активность с искусственными акцепторами электронов, такими как ФМС. Таким образом, эффективный перенос электронов с субстрата, либо метанола, либо формальдегида, через активный центр окислительно-восстановительного кофактора РQQ возможен при использовании природных или синтетических переносчиков электронов. Из-за отсутствия видимых светопоглощающих субстратов или продуктов для считывания результатов анализа требуется краситель, поэтому в качестве переносчиков электронов использовали окислительно-восстановительную систему – ФМС + ДХФИФ [42]:

Рисунок 16. Окисление метанола МДГ в присутствии искусственных акцепторов электронов ФМС (PMS) и ДХФИФ (DCPIP)

Данный комплекс медиаторов является универсальным для определения активности дегидрогеназ. Так, ДХФИФ восстанавливается флавопротеиновыми ферментами, а добавление ФМС, в качестве



промежуточного переносчика электронов, позволяет соединиться с никотинамиднуклеотидсвязанными дегидрогеназами [31].

Активность МДГ определяли спектрофотометрически при 600 нм, 30°C и толщине кюветы 1 см на приборе ПЭ-5400УФ (ЭКРОС, Россия). График кинетической зависимости оптической плотности от времени выглядит следующим образом (рисунок 17):

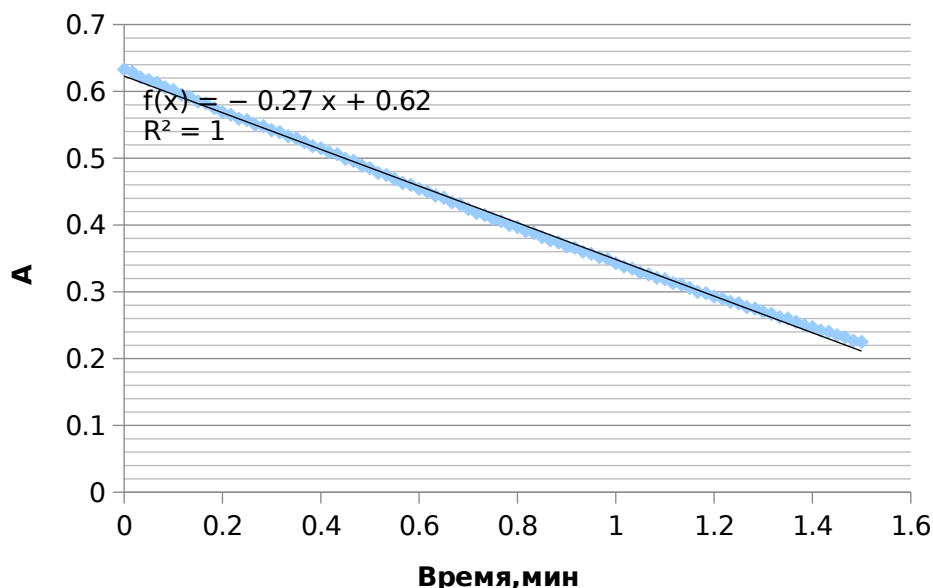


Рисунок 17. Зависимость оптической плотности от времени при проведении реакции для определения активности МДГ в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM160 (600 нм)

Как можно заметить, данная зависимость носит отрицательный характер (уменьшение оптической плотности) вследствие уменьшения степени поглощения света. Это связано с протеканием ферментативной реакции, в которой метанол, под действием фермента МДГ, превращается в формальдегид, в результате чего изменяется окраска раствора с темно-зеленой на желто-зеленую, поскольку восстановленные формы ДХФИФ и ФМС бесцветны.

4.3. Характеристики фермента МДГ в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM160

4.3.1. Активация фермента МДГ

Известно, что фермент МДГ проявляет свою активность в присутствии активатора NH_4Cl . Рассмотрим кинетический механизм для реакционного цикла МДГ с аммонием в качестве активатора (рисунок 18):

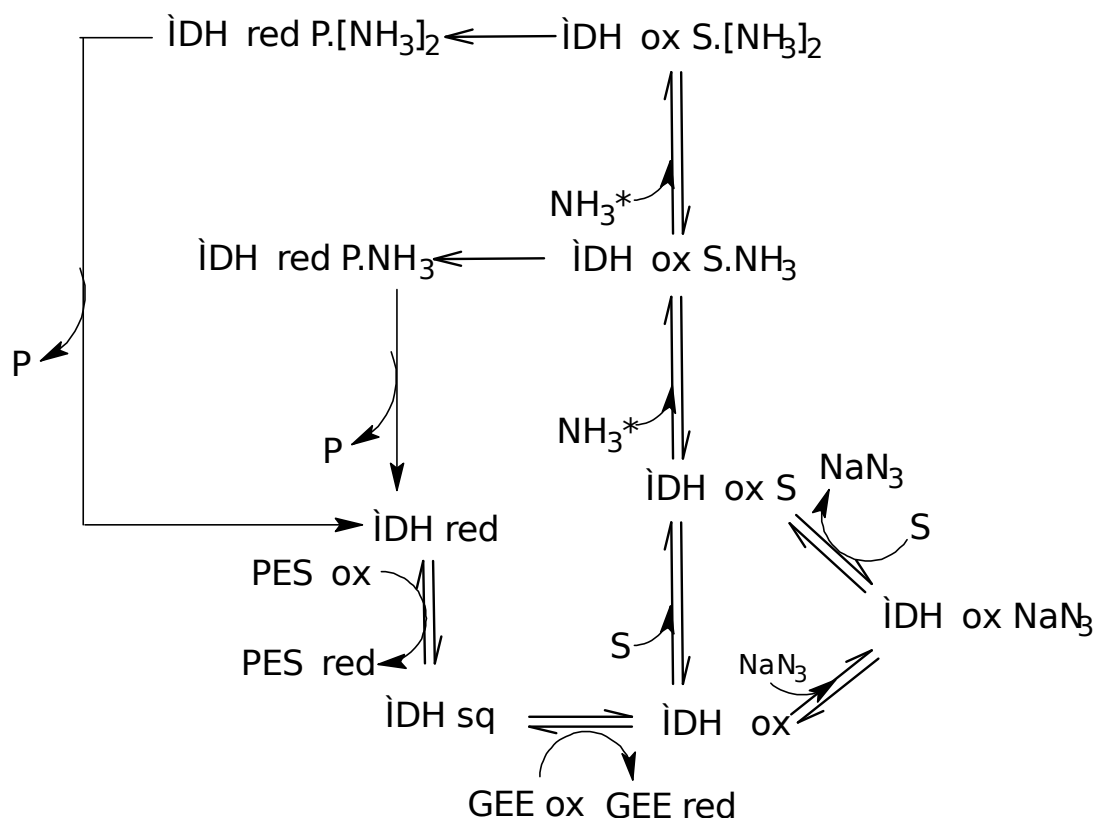


Рисунок 18. Кинетический механизм для реакционного цикла МДГ с аммонием в качестве активатора, где (S-субстрат, P-продукт, PES-ФМС, GEE-ДХФИФ)

Восстановленная форма фермента МДГ под действием искусственной окислительно-восстановительной системы переносчиков электронов переходит в окисленную форму. Под действием азиды натрия, который является конкурентным ингибитором МДГ по отношению к субстрату, подавляется эндогенная активность, которая мешает в определении кинетических констант, тем самым мы получаем фермент-субстратный комплекс, состоящий из МДГ и метанола. МДГ содержит 3 сайта связывания для ФМС, ДХФИФ и катионов аммония: структурно определяемый активирующий сайт связывания в активном центре МДГ (K_I), структурно определяемый ингибирующий сайт связывания в активном центре МДГ (K_S) и структурно определяемый ингибирующий сайт связывания для связывания ФМС, расположенный отдельно от входа в активный центр фермента МДГ (K_I'). ФМС стыкуется только с участком K_I' , который перекрывает вход в канал доступа к субстрату, так как слишком велик, чтобы занимать полость, содержащую участки K_I и K_S . ДХФИФ занимает все три сайта связывания: K_S и часть сайта K_I , сайт K_I и

отдельный сайт у входа в активный сайт K_1' . Для активации фермент-субстратного комплекса добавляют катион аммония, который последовательно заполняет 2 сайта связывания вблизи кофактора PQQ-сначала с активирующим K_i , потом с ингибирующим K_i . Связь с данными сайтами обеспечивает два кинетических пути к двухэлектронной восстановленной форме МДГ, благодаря которой выделяется продукт [43].

Чтобы проверить активационные свойства катионов аммония, измеряли оптическую плотность МДГ в зависимости от концентрации NH_4Cl . По расчетным формулам определяли активность, удельную активность и суммарную активность МДГ в бесклеточном экстракте.

По полученным данным, представленными в приложении 1-2, был построен график зависимости удельной активности фермента МДГ от концентрации NH_4Cl (рисунок 19):

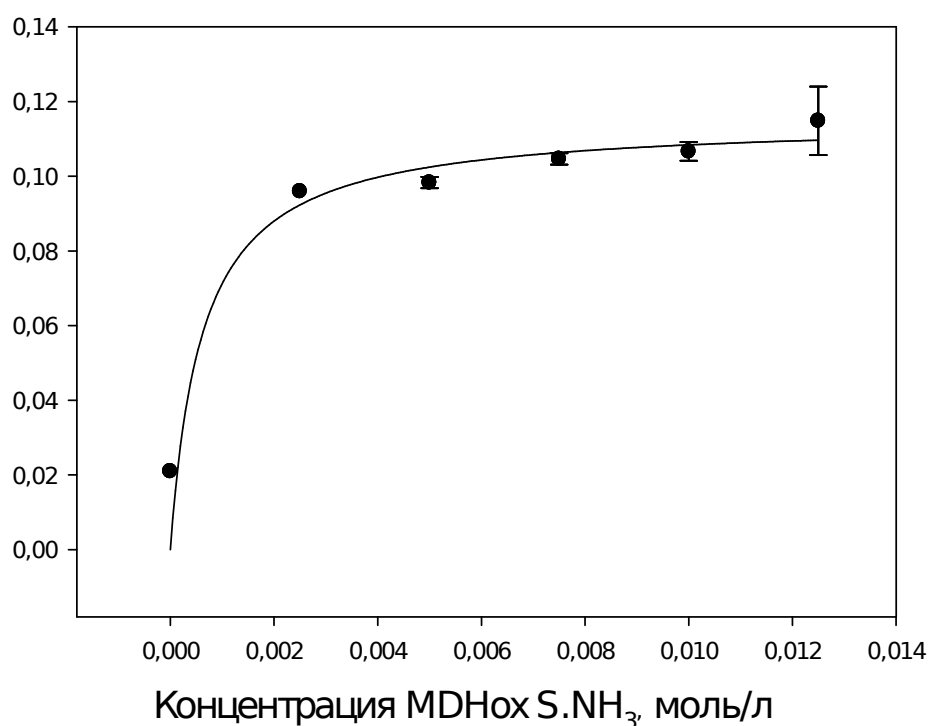


Рисунок 19. Зависимость удельной активности МДГ в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM160 от концентрации фермент-субстратного комплекса

Максимальная удельная активность МДГ в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM160 от концентрации NH_4Cl равна 0,145 Ед/мг белка.

Экспериментальные данные аппроксимировали с помощью уравнения Михаэлиса-Ментен и получили следующие результаты, представленные в таблице 7.

Таблица 7. Параметры уравнения Михаэлиса-Ментен для бесклеточного экстракта *M.extorquens* pCM160 в присутствии активатора NH_4Cl

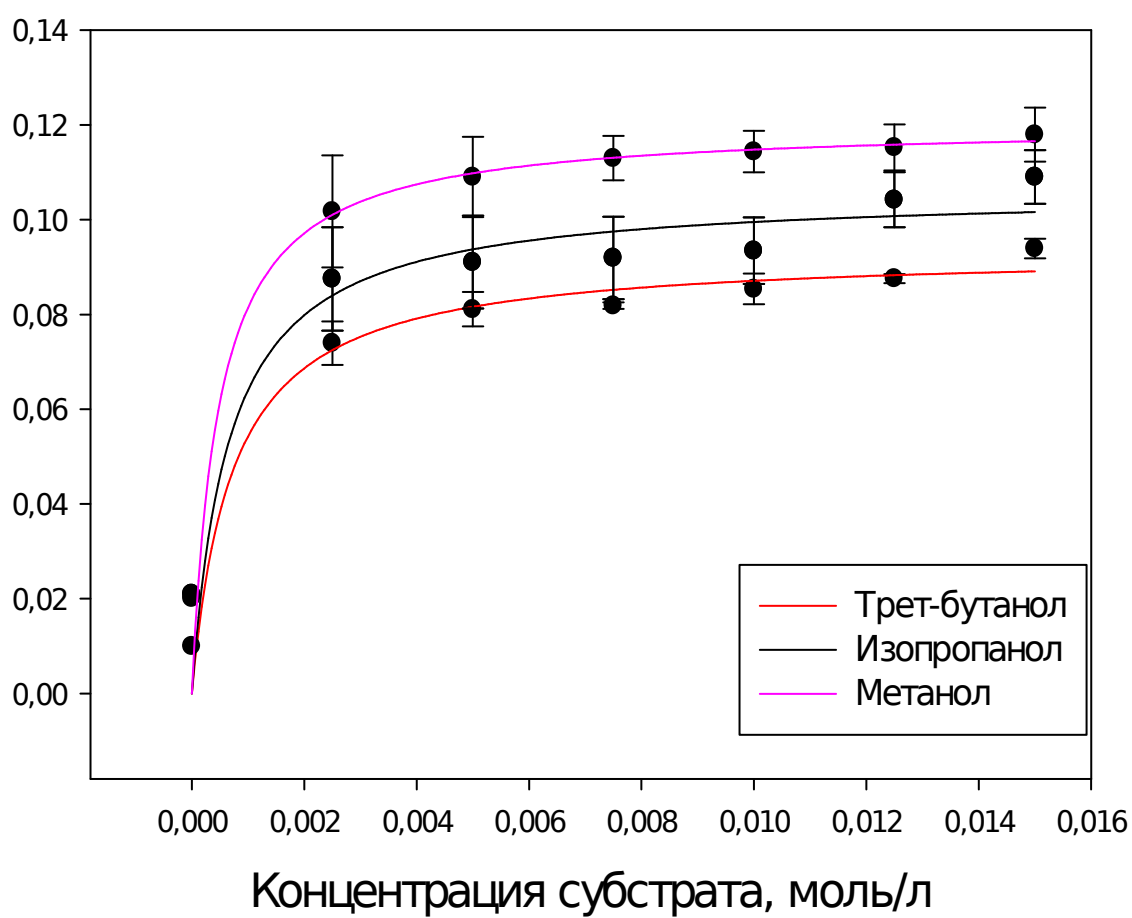
Параметр	NH_4Cl
V_{\max} , Ед/мг белка	$0,115 \pm 0,005$
K_M , мМ	$0,6 \pm 0,3$
R^2	0,9432

Проведя спектрофотометрический анализ с последовательным добавлением активатора NH_4Cl , можно сделать вывод, что с увеличением концентрации NH_4Cl активность фермента МДГ возрастает, а без этого активатора фермент МДГ не будет проявлять активности, т.е катализировать окисление метанола в формальдегид, поэтому его добавление необходимо для проведения последующих экспериментов.

4.3.2.Определение субстратной специфичности фермента МДГ в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM160

Субстратную специфичность МДГ оценивали по величине изменения удельной активности фермента на одну и ту же концентрацию субстрата. В качестве субстратов использовали спирты различного строения и карбоновые кислоты в концентрациях 0,1 моль/л. Использование дикарбоновой кислоты, как субстрата, обусловлено данными о способности дикого штамма *M. extorquens* AM1 использовать сукцинат в качестве источника углерода [6]. Предполагаем, что окисление щавелевой кислоты у рекомбинантного штамма *M.extorquens* pCM160 идет по аналогичной схеме.

Полученные данные для образца представлены в приложении 3,4 и на рисунках 20,21.



Р

исунок 20. График зависимости удельной активности фермента МДГ в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM160 от концентрации спиртов различного строения (0,1M)

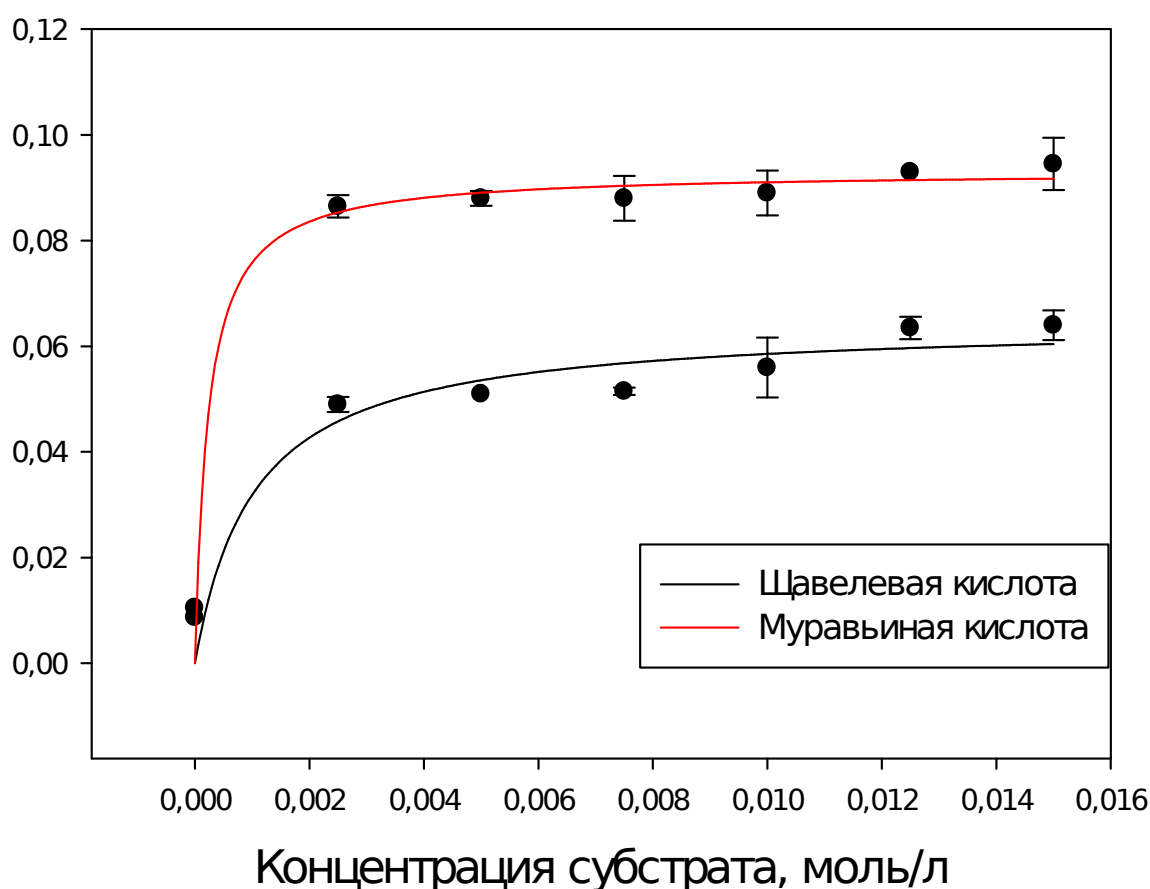


Рисунок 21. График зависимости удельной активности ферментов в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM160 от концентрации кислот (0,1M)

Проанализировав субстратную специфичность МДГ в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM160, можно выявить зависимость уменьшения окислительной активности фермента с увеличением разветвлённости углеродной цепи субстрата. Максимальная активность и удельная активность образца приходится на субстрат метанол (1,362 Ед/мл и 0,123 Ед/мг белка), трет-бутанол (максимальная активность 1,048 Ед/мл и удельная активность 0,095 Ед/мг белка), изопропанол (максимальная активность 1,234 Ед/мл и удельная активность 0,112 Ед/мг белка), муравьиная кислота (максимальная активность 1,086 Ед/мл и удельная активность 0,098 Ед/мг белка), щавелевая кислота (максимальная активность 0,733 Ед/мл и удельная активность 0,066 Ед/мг белка).

МДГ не является высокоспецифичным ферментом, проявляя высокую активность по отношению к метанолу.

4.3.3. Определение кинетических параметров фермента МДГ в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM160 по отношению к различным субстратам

Для описания кинетики ферментативных реакций в гомогенных условиях используют гиперболическое уравнение Михаэлиса-Ментен с двумя параметрами.

Уравнение Михаэлиса-Ментен:

$$V = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_M + [S]}$$

где V – начальная скорость при концентрации субстрата [S];

V_{\max} – максимальная скорость ферментативной реакции, Ед/мг белка;

K_M – константа Михаэлиса-Ментен, мМ

Экспериментальные данные аппроксимировали с помощью уравнения Михаэлиса-Ментен и получили следующие результаты, представленные в таблице 8.

Таблица 8. Параметры уравнения Михаэлиса-Ментен для бесклеточного экстракта *M.extorquens* pCM160

Параметр	Метанол	Изопропанол	Трет-бутанол	Муравьиная кислота	Щавелевая кислота
V_{\max} , Ед/мг белка	0,1±0,003	0,1±0,006	0,09±0,004	0,093±0,002	0,065±0,003
K_M , мМ	0,4±0,2	0,5±0,4	0,7±0,3	0,2±0,1	1,0±0,4
R^2	0,9455	0,8983	0,9049	0,9813	0,9428

На основании полученных данных можно отметить, что максимальная скорость для четырех субстратов находится практически на одинаковом уровне, за исключением значения для щавелевой кислоты.

Константа Михаэлиса (K_M) численно равна концентрации субстрата, при которой достигается половина максимальной скорости, и характеризует сродство фермента к данному субстрату. Как известно, чем меньше K_M , тем больше сродство фермента к субстрату и тем выше начальная скорость реакции. Анализируя данные, представленные в

таблице 8 можно выявить зависимость увеличения K_m с увеличением разветвленности углеводородного радикала.

Наименьшая K_m характерна для муравьиной кислоты ($0,2 \pm 0,1$ мМ), предположительно это связано с тем, что в работе мы использовали не чистый фермент МДГ, а бесклеточный экстракт, в котором находится не только фермент МДГ, но и другие ферменты, такие как формальдегидДГ и формиатДГ.

Если рассмотреть строение муравьиной кислоты можно выделить альдегидную группу, которая окисляется у данных метилотрофов формальдегиддегидрогеназой, либо МДГ (рисунок 6). Поэтому, учитывая значения удельных активностей мы видим, что активность фермента МДГ на муравьиную кислоту повышена ($0,098$ Ед/мг белка), при этом K_m минимальная, что может быть обусловлено неспецифическим окислением гидратированной формы муравьиной кислоты МДГ (рисунок 22).

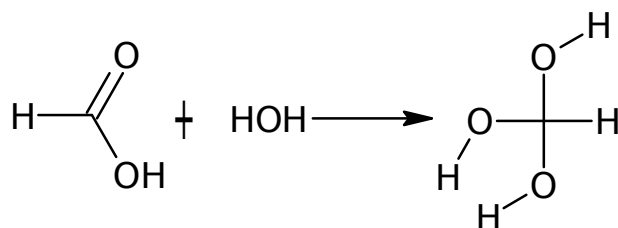


Рисунок 22. Образование гидратированной формы муравьиной кислоты

Высокое значение K_m и минимальное значение удельной активности для субстрата щавелевой кислоты обусловлено тем, что данная дикарбоновая кислота окисляется формиатДГ сразу до конечного продукта углекислого газа. Этот вывод сделан, опираясь на статью 2012 года, где рассматривается использование мультисистемы субстратов сукцинат+метанол и где было выявлено, что сукцинат в течении времени превращается в углекислый газ т.е. окисляется формиатДГ. При переходе от сукцината к метанолу выделялось больше всего формиата, следовательно, способность потреблять формиат изначально была меньше, чем способность производить формиат, тем самым сукцинат помогает клеткам дикого штамма *M. extorquens* AM1 не накапливать формальдегид до токсичного уровня. Предполагаем, что окисление щавелевой кислоты у рекомбинантного штамма *M.extorquens* pCM160 идет по аналогичной схеме [6].

Таким образом, в результате определения кинетических параметров фермента МДГ в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM160 было определено, что сродство фермента МДГ к метанолу выше ($K_M = 0,4 \pm 0,2$ мМ), чем сродство данного фермента с изопропанолом, трет-бутанолом, муравьиной кислоте.

При сравнении с данными из базы данных BRENDA было доказано, что полученное значение K_M для метанола ($K_M = 0,4 \pm 0,2$ мМ) согласуется с литературой ($K_M = 0,36 \pm 0,07$ мМ) [38].

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

Присутствие солей металлов в значительной степени определяет скорость ферментативной реакции, так и активность фермента, потому что ионы металлов могут замещать ионы в активном центре фермента активируя или ингибируя действие фермента.

В ряде случаев ионы металлов (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+}) выполняют функции простетических групп ферментов, могут служить акцепторами или донорами электронов, 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+} , Co^{2+}) могут являться неспецифичными ингибиторами и приводить к необратимой денатурации белковой части любого фермента.

Поэтому проверяли влияние ионов металлов на удельную активность фермента МДГ. Измерения проводили по стандартной методике определения активности фермента спектрофотометрическим методом с использованием метанола в качестве субстрата, заменив вносимые 200 мкл воды на 200 мкл 0,01 М растворов солей металлов. Данную концентрацию выбирали исходя из данных единой информационной базы BRENDA для фермента МДГ. Смесь инкубировали в течение 5 минут при температуре 30°C после чего активировали реакцию внесением бесклеточного экстракта *M.extorquens* pCM160. Удельная активность контрольной смеси была принята за 100%, значения активностей в присутствии солей металлов рассчитывались как процентное отношение к контрольному раствору. Полученные значения представлены в таблице 9.

Таблица 9. Влияние солей металлов на активность МДГ в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM160

Вещество	Концентрация, М	Активность, %
Контроль	0,01	100
NaCl		103,5
CaCl ₂		114
BaCl ₂		112
SrSO ₄		108
CoSO ₄ ×7H ₂ O		45
Pb(CH ₃ COO) ₂		91
ZnSO ₄ ×7H ₂ O		90
MgSO ₄ ×7H ₂ O		93

Анализируя таблицу 9 видно, что при внесении раствора соли Ca²⁺ наблюдается увеличение активности МДГ в бесклеточном экстракте (на 14%), так как этот ион тесно связан с активным центром фермента. Как известно из литературных данных ион Ca²⁺, находящийся в активном центре фермента, поддерживает PQQ в нужной конфигурации [20].

Незначительное увеличение активности МДГ в бесклеточном экстракте так же наблюдается с растворами солей Ba²⁺ и Sr²⁺, так как ион Ca²⁺ может быть заменен в активном центре этими ионами, причем сродство фермента к этим ионам аналогично сродству к Ca²⁺ [35].

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 [36]-[37], но механизм взаимодействия ионов Cu²⁺ с МДГ не был изучен. Анализируя химические свойства данного иона, можно предположить, что он образует хелатный комплекс с молекулами PQQ (структура [5] на рисунке 4), тем самым изменяя конформацию активного центра и вызывая полное подавление активности.

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

Как известно из литературного источника, МДГ в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM160 сохраняет свою активность при хранении

-70°C (незначительная потеря активности через 6 месяцев), -20°C и +4°C (потеря 80% активности в течении 1 недели) [38].

Для изучения стабильности МДГ при различных условиях хранения подготовили 2 образца бесклеточного экстракта *M.extorquens* pCM160. Анализируемые образцы хранили в микропробирках при +4°C и -20°C. Перед проведением анализа замороженный образец размораживался в ледяной бане, с контролем температуры +4°C. Эксперимент проводили по стандартной методике определения активности фермента МДГ спектрофотометрическим методом. Результаты приведены в таблице 10 и на рисунке 23.

Таблица 10. Стабильность фермента МДГ в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM160 при +4°C и -20°C

Время хранения, сутки	Удельная активность при температуре хранения, Ед/мг белка	
	+4°C	-20°C
1	0,111	0,128
3	0,044	0,125
7	0,017	0,123
15	0	0,110
25	0	0,110
30	0	0,106

Продолжение таблицы 10

37	0	0,100
45	0	0,088
51	0	0,088
60	0	0,088

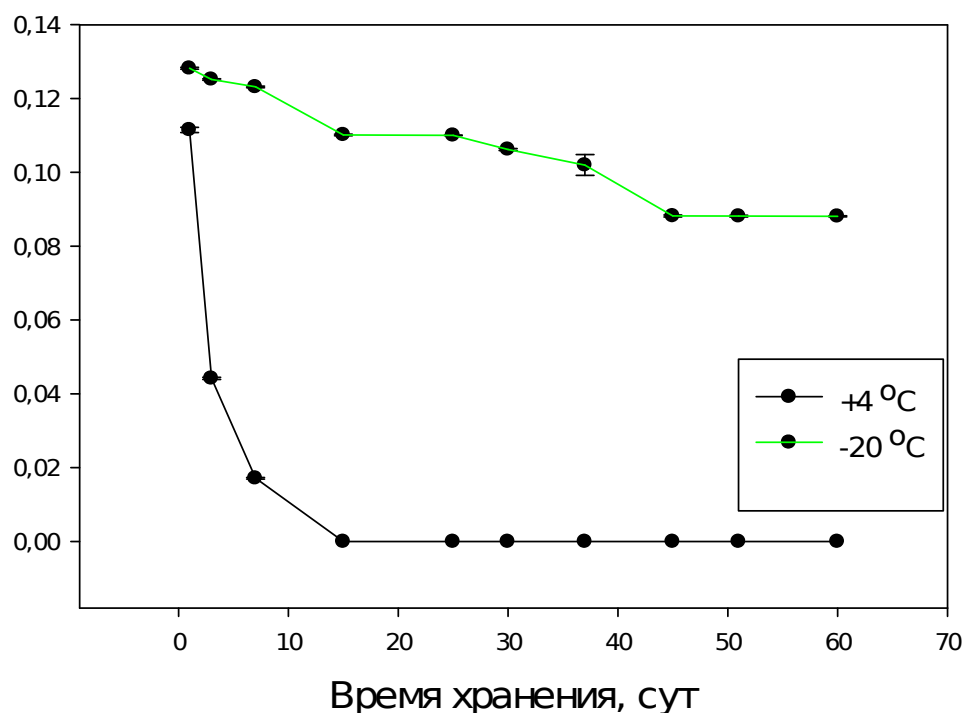


Рисунок 23. График зависимости удельной активности фермента МДГ в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM160 от времени хранения при +4°C и -20°C

По получившимся результатам, представленным в таблице 10, можно сделать вывод, что удельная активность образца, хранившегося при +4°C, снизилась на 60% на третьи сутки, в течении недели на 85% и полностью отсутствовала после седьмых суток. Данный вид хранения бесклеточного экстракта не позволяет использовать биоматериал при анализе в долгосрочной перспективе. А образец бесклеточного экстракта *M.extorquens* pCM160, хранившийся при -20°C, за 60 суток потерял активность на 31%, что позволяет использовать данный биоматериал при дальнейших измерениях.

Таким образом, чтобы сохранить каталитическую активность фермента необходимо соблюдать условия хранения при минусовых температурах -20°C или ниже.

4.3.6. pH стабильность фермента МДГ в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM160

Известно, что для любого фермента существует определенная область pH, так как уменьшение и увеличение pH приводит к снижению оптимальной активности. Исследования показали, что значение

оптимального pH, связано с сильной зависимостью pH от скорости окисления восстановленных ферментных форм ($\text{МДГ}_{\text{вос}}$), с помощью искусственных акцепторов электронов ($\text{ФМС} + \text{ДХФИФ}$) [44]. Кроме того, при высоких значениях pH происходит деалкилирование искусственного переносчика электронов ФМС, что приводит к образованию альдегидов и способствует увеличению эндогенной активности, делая невозможным определение кинетических параметров [43]. В связи с этим определяли pH-стабильность МДГ в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM160. Для этого подбирали буферные растворы с разными значениями pH, разбавляли экстракт буфером в соотношении 1:1 и инкубировали в течение 30 минут, а потом измеряли оптическую плотность с помощью спектрофотометра. По расчетным формулам определяли удельную активность фермента МДГ. Максимальная удельная активность, соответствующая значению pH 9, была принята за 100%, а значения при остальных значениях pH рассчитывались как процентное отношение к максимуму (таблица 11). По полученным данным построили график зависимости удельной активности МДГ в % от максимума при различных pH (рисунок 24).

Таблица 11. Используемые буферы и соответствующие им удельные активности МДГ в бесклеточном субстрате *M.extorquens* pCM160

Буфер 0,1М	pH	Удельная активность, Ед/мг белка	Удельная активность, % от максимума
Ацетат-NaOH	4	0,059	48
Ацетат-NaOH	5	0,091	74
$\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$	6	0,109	88
$\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$	7	0,118	96
Tris-HCl	8	0,119	96
Tris-HCl	9	0,123	100
Глицин-NaOH	10	0,121	98
$\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaOH}$	11	0,119	96

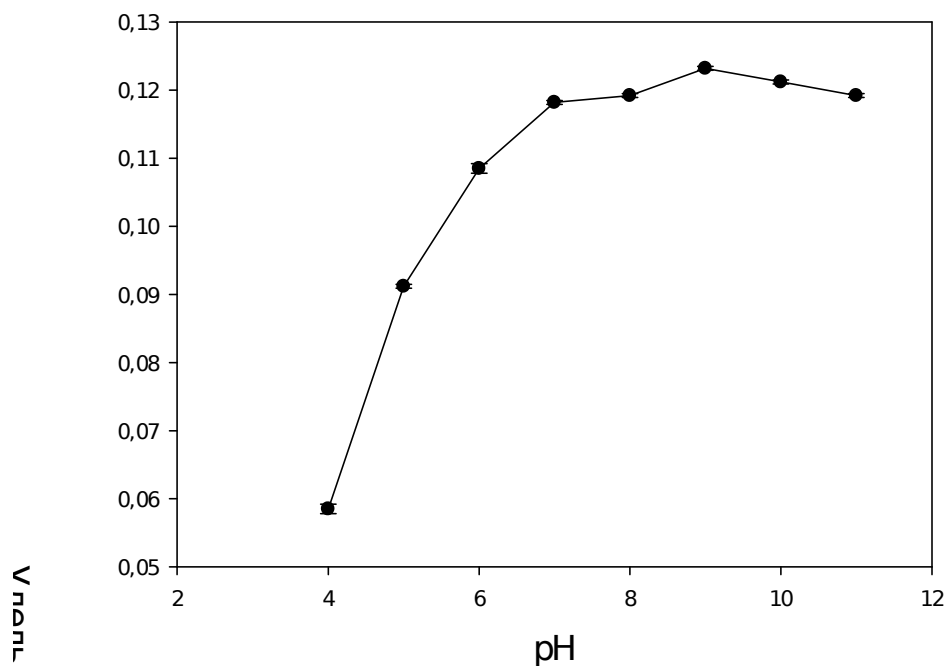


Рисунок 24. График зависимости удельной активности МДГ в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM160 от различных pH

Из рисунка 24 видно, что максимальная активность МДГ наблюдается в диапазоне pH 7-11, что согласуется с литературным источником [35].

4.4.Суммарная таблица по рассмотренным характеристикам

Микроор-га-низм	Макс. субстрат-ная специ-фичнос-ть	K_M	V_{max}	Акти-ва-тор	Ин-гиб-и-тор	Стабиль-ность фермен-та	pH ста-бил-ь-ност-ь
<i>Methylobacterium extorquens</i> pCM160	Метанол, муравьи-ная кислота	метанол 0,4±0,2 мМ, изопропа- нол 0,5±0,4 мМ, трет- бутанол 0,7±0,3 мМ; муравьи- ная 0,2±0,1 мМ.	метанол 0,1±0,003 Ед/мг белка, изопропа- нол 0,1±0,006 Ед/мг белка, трет- бутанол 0,09±0,00 4 Ед/мг белка, муравьи- ная 0,093±0,0 02 Ед/мг белка.	Ca ²⁺ , Ba ²⁺ , Sr ²⁺ , NH ⁴⁺	Co ²⁺ , Cu ²⁺	-20°C (за 60 суток активнос- ть уменьши- лась на 31%); +4°C (активно- сть снижает- ся на 85% на седьмые сутки)	7-11

Выводы

1. Нарастили биомассу бактерий *Methylobacterium extorquens* pCM160 и получили бесклеточный экстракт *M.extorquens* pCM160, объем которого составил 7,1 мл, исходная концентрация белка 11,04 мг/мл, суммарный белок 78,4 мг;

2. Определили субстратную специфичность фермента МДГ в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM16 от концентрации различных субстратов, в результате чего, самый большой ответ приходится на метанол (максимальная активность 1,362 Ед/мл и удельная активность 0,123 Ед/мг белка);

3. Наибольшее сродство фермента МДГ в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM16 к метанолу $K_M = 0,4 \pm 0,2$ мМ. Максимальные скорости реакции окисления спиртов и альдегидов под действием МДГ для четырех субстратов приблизительно равны: метанол $0,1 \pm 0,003$ Ед/мг белка, изопропанол $0,1 \pm 0,006$ Ед/мг белка, трет-бутанол $0,09 \pm 0,004$ Ед/мг белка, муравьиная кислота $0,093 \pm 0,002$ Ед/мг белка;

4. При проверке влияния ионов металлов на удельную активность фермента МДГ получились следующие результаты: при добавлении ионов металлов Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} наблюдается увеличение активности МДГ в бесклеточном экстракте на 8-14%; при добавлении ионов металлов Pb^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} и Mn^{2+} наблюдается незначительное снижение активности на 7-10%; при добавлении солей тяжелых металлов (Co^{2+}) происходит сильное ингибирование на 55% и полное подавление активности раствором соли Cu^{2+} .

5. Определили стабильность фермента в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM160 при +4°C и -20°C, получили следующие результаты: при +4°C активность фермента снижается на 85% на седьмые сутки, а потом полностью отсутствует после седьмых суток; при -20°C за 60 суток активность уменьшается на 31%.

6. Определили рН стабильность фермента в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM160, максимальная активность которого наблюдается в диапазоне рН 7-11.

7.

Список использованной литературы

1. Ю. А. Троценко. Аэробные метилотрофы – перспективные объекты современной биотехнологии // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. 2012. Т. 5. № 3. С. 243-279.
2. Nakagawa T., Mitsui R., Tani A., Sasa K., Tashiro S., Iwama T., Hayakawa T., Kawai K. A catalytic role of HoxF1 as La^{3+} -dependent methanol dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* strain AM1 // PLoS ONE. 2012. V. 7. № 11;
3. Anthony C. The biochemistry of methylotrophs // New York, NY: Academic Press – 1982.
4. Цыганков Ю.Д. Физиологическая характеристика метилотрофных бактерий. Биология термофильных микроорганизмов // Ю.Д. Цыганков. - Москва: Наука. 1986. С. 31- 50.
5. Lidstrom M.E. Aerobic methylotrophic prokaryotes // New York: Springer-Verlag. 2006. Chapter 1.20.P. 618-634.
6. Elizabeth Skovran; Gregory J. Crowther; Xiaofeng Guo; Song Yang; Mary E. Lidstrom. A Systems Biology Approach Uncovers Cellular Strategies Used by *Methylobacterium extorquens* AM1 During the Switch from Multi- to Single-Carbon Growth // PLoS ONE. 2012. № 5.
7. A.Y.Chistoserdov, L.V.Chistoserdova, W.S.McIntire, M.E.Lidstrom. Genetic organization of the mau gene cluster in *Methylobacterium extorquens* AM1: complete nucleotide sequence and generation and characteristics of mau mutants // J Bacteriol. 1994. V. 176. P. 4052 - 4065.
8. Delmotte N., Knief S., Chaffron G., Innerebne, B., Roschitzki R., Schlapba, C., von Mering, and J. A. Vorholt. Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2009. V. 106. P. 16428-16433.
9. Corpe Washington. Method for detecting methylotrophic bacteria on solid surfaces // J. Microbiol. 1985. V.3. P. 215-221.
- 10.W.A.Corpe, S.Rheem. Ecology of methylotrophic bacteria on the surface of living leaves // FEMS Microbiol Ecol. 1989. V. 62. P.243-250.
11. Kneff S., Delmontt H., Saffron S., Stark M., Innebner G., Wassman P., von Mering S., Worholt I.A // ISME. 2012. V.6. P. 1378-1390.

12. Abanda-Nkpwatt D., Musch M., Tschiersch J., Boettner M., Schwab W. Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: stimulating growth, methanol consumption and localization of the methanol emission site // J Exp Bot. 2006. V.57. P. 4025–4032.
13. Miller V.G., Brandl M.T., Quinones B., Lindou S.E. Biological Sensor for Sucrose: Relative Sensitivity of Various Reporter Genes // Appl Environ Microbiol. 2001. V.67. P.1308–1317.
14. Leveau J.H, Lindow S.E. Epiphytic appetite: quantitative monitoring of the consumption of bacterial sugar in the phyllosphere // Proc Natl Acad Sci USA.-2001. V.98. P. 3446–3453.
15. Hüve K, Christ MM, Kleist E, Uerlings R, Niinemets U, et al. Simultaneous growth and emission measurements demonstrate interactive control of methanol release during leaf expansion and stomata // J Exp Bot . 2007. V.58. P. 1783–1793.
16. Salem A.R, Hacking A.J, Quayle J.R. Lack of MalA-CoA Lyase in the Pseudomonas AM1 Mutant // J Gen Microbiol. 1976. V.81. P. 525–527.
17. Harder W, Quayle J.R. The biosynthesis of serine and glycine in Pseudomonas AM1 with particular emphasis on growth on carbon sources other than compounds C₁ // Biochem J. 1971. V.121. P. 753–762.
18. Мосин О. В., Игнатов И., Эволюция, метаболизм и биотехнологическое использование метилотрофных микроорганизмов/ Биология в школе, Изд.: ООО «Школьная пресса» - 2013;
19. P.R. Afolabi, F. Mohammed, K. Amaratunga, O. Majekodunmi, S.L. Dales, R. Gill, D. Thompson, J.B. Cooper, S.P. Wood, P.M. Goodwin, C. Anthony. Site-directed mutagenesis and X-ray crystallography of the PQQ-containing quinoprotein methanol dehydrogenase and its electron acceptor, cytochrome c_L // Biochemistry. 2001. V.40. P.9799–9809.
20. C. Anthony, P. Williams. The structure and mechanism of methanol dehydrogenase // Biochimica et Biophysica Acta. – 2003.
21. Rémi Peyraud, Patrick Kiefer, Philipp Christen, Jean-Charles Portais, Julia A.Vorholt. Co-Consumption of Methanol and Succinate by *Methylobacterium extorquens* AM1// PLoS ONE. 2012. № 7.

22. Salem, A. R., Wagner, C., Hacking, A. J. & Quayle, J. R. The metabolism of lactate and pyruvate by *Pseudomonas* AM1 // J Gen Microbiol. 1973. V.76. P. 375-388.

23. Taylor, I. J. & Anthony, C. A biochemical basis for obligate methylotrophy: properties of a mutant of *Pseudomonas* AM1 lacking 2-oxoglutarate dehydrogenase // J Gen Microbiol. 1976. V.93. P. 259-265.

24. Bolbot, J. A. & Anthony, C. The metabolism of 1,2-propanediol by the facultative methylotroph *Pseudomonas* AM1 // J Gen Microbiol. 1980. V.120. P. 245-254.

25. Van Dien, S. J. & Lidstrom, M. E. Stoichiometric model for evaluating the metabolic capabilities of the facultative methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1, with application to reconstruction of C₃ and C₄ metabolism // Biotechnol Bioeng. 2002. V.78. P. 296-312.

26. Lidstrom, M. E. The genetics and molecular biology of methanol utilizing bacteria. In Methane and Methanol Utilizers, pp. 183-206. Edited by J. C. Murrell & H. Dalton // New York: Plenum. 1992.

27. Van Dien S.J, Okubo Y, Hough M.T, Короткова Н., Taitano T, et al. *Methylobacterium extorquens* AM1 metabolism recovery of C (3) and C (4) metabolism using transposon mutagenesis // Микробиология. 2003. V.149. P. 601-609.

28. Комов В.П., Шведова В.Н., Биохимия: Учеб. для вузов/ - М.: Дрофа - 2004.

29. Северин Е.С. , Биохимия: Учебник/ Под ред. Е.С. Северина. - 2-е изд., испр. - М.:ГЭОТАР-МЕД - 2004.

30. Польшгалына Г.В., Чередныченкo В.С., Рымарева Л.В. Определение активности ферментов. Справочник. М., ДеЛи принт, - 2003.

31. Досон Р., Эллыот Д. Справочник биохимика: Пер. с англ./ Досон Р., Эллыот Д., Эллыот У., Джонсон К. - М.: Мир, 1991.

32. Avezoux A1, Goodwin MG, Anthony C. The role of the novel disulphide ring in the active site of the quinoprotein methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* // Biochem J. 1995. V.307. P. 735-741.

33. Day, D.J. Methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* AM₁ / D.J. Day and C. Anthony // Methods Enzymol. 1990. V. 188. P. 210-216;
34. Грачева И.М., Грачев Ю.П. Лабораторный практикум по технологии ферментативных препаратов: Учебное пособие для вузов. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. – 240 с.
35. Goodwin, M.G.; Avezoux, A.; Dales, S.L.; Anthony, C. Reconstitution of the quinoprotein methanol dehydrogenase from inactive Ca (2+)-free enzyme with Ca²⁺, Sr²⁺ or Ba²⁺ // Biochem. J. 1996. V.319. P. 839-842.
36. Backor M., Fahselt D., Davidson R.D., Wu C.T. Effects of Copper on Wild and Tolerant Strains of the Lichen Photobiont *Trebouxia erici* (Chlorophyta) and Possible Tolerance Mechanisms // Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 2003. V.45. P. 159-167.
37. Faixová Z., Faix Š. Influence of Metal Ions on Ruminant Enzyme Activities // Acta Veterinaria Brno. 2002. V.71. P. 451-455.
38. BRENDA - The Comprehensive Enzyme Information System // Information on EC 1.1.2.7 - methanol dehydrogenase (cytochrome c): [сайт]. URL: <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.1.2.7> (дата обращения 7.05.2020).
39. C. Anthony. Methanol dehydrogenase, a PQQ-containing quinoprotein dehydrogenase, Sub-Cell // Biochem. 2000. V.35. P. 73-118.
40. Катыхина А.В., Кузнецова Т.А. Изучение специфичности биокатализаторов, полученных из *Methylobacterium extorquens* pCM16 в присутствии медматора элетронного транспорта -ферроцена // Школа юных инноваторов: Сборник научных статей Итоговой конференции (10-17 декабря 2018 года). С.160-163.
41. Кузнецова Т.А. Биокаталитические свойства клеток *Methylobacterium extorquens* дикого и рекомбинантного штаммов // Известия Тульского государственного университета. Химические науки. 2017. Вып.4. С. 3-10.
42. Bérénice Jahn, Niko S. W. Jonasson, Hurina Hu, Helena Singer, Arjan Pol, Nathan M. Good, Huub J. M. Op den Camp, N. Cecilia Martinez-Gomez, Lena J. Daumann. Understanding the chemistry of the artificial electron acceptors PES, PMS, DCPIP and Wurster's Blue in methanol dehydrogenase

assays // JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry.2020. V.25. P.199-212.

43.Parvinder Hothi, Michael J.Sutcliffe, Nigel S.Scrutton. Kinetic isotope effects and ligand binding in PQQ-dependent methanol dehydrogenase // Biochem J.2005.V.388.P.123-133.

44. J. Frank Jr , M. Dijkstra, J.A. Duine, C. Balny. Kinetic and Spectral Studies on the Redox Forms of Methanol Dehydrogenase From *Hyphomicrobium X* // J. Biochem. 1988. V.174. P.331-338.

Приложения

Приложение 1

Экспериментальные данные спектрофотометрического анализа с
последовательным добавлением активатора NH_4Cl

Концентрация, моль /л	ОП _{600/мин} холостой опыт	ОП _{600/мин} анализ. образец	Разведение образца , раз	Объем образца, мл	Объем смеси, мл
0,015	0,003	0,7642	1	0,05	2
		0,7486			
		0,7322			
0,0125		0,6539			
		0,5579			
		0,6044			
0,01		0,547			
		0,5659			
		0,5732			
0,0075		0,5445			
		0,5568			
		0,5514			
0,005		0,5134			
		0,5267			
		0,5169			
0,0025		0,5067			
		0,5042			
0		0,1136			

Приложение 2

Расчетные данные активности МДГ с последовательным
добавлением активатора NH_4Cl

Концентрация, моль/л	Активность, Ед/мл	Исходная концентрация белка мг/мл	Удельная активность, Ед/мг белка
0,015	1,603	11,042	0,145
	1,570		0,142
	1,535		0,139
0,0125	1,370		0,124
	1,168		0,106
	1,266		0,115
0,01	1,145		0,104
	1,185		0,107
	1,200		0,109
0,0075	1,140		0,103
	1,166		0,106
	1,155		0,105
0,005	1,075		0,097
	1,103		0,100
	1,082		0,098
0,0025	1,060		0,096
	1,055		0,096
0	0,233		0,021

Приложение 3

Экспериментальные данные спектрофотометрического анализа
бесклеточного экстракта *M.extorquens* pCM160

Субстрат	ОП _{600/мин} холостой опыт	ОП _{600/мин} анализ. образец	Разведен ие образца, раз	Объем образца , мл	Объем смеси, мл
метанол	0,003	0,65	1	0,05	2
изопропано л		0,585			
трет- бутанол		0,488			
муравьиная кислота		0,519			
щавелевая кислота		0,351			

Приложение 4

Расчетные данные активности МДГ бесклеточного экстракта
M.extorquens pCM160 на разные субстраты

Субстрат	Активность, Ед/мл	Исходная концентрация белка мг/мл	Удельная активность, Ед/мг белка
метанол	1,362	11,042	0,123
изопропано л	1,234		0,112
трет- бутанол	1,048		0,095
муравьиная кислота	1,086		0,098
щавелевая кислота	0,733		0,066

АнтиПлагиат.NET

Нав. Права. Вкл. Отображ. Дополнительно. Справка

Планируя проверку Проверка дата Проверка SEO Проверка копиров

Проверить уникальность

Итерировать домены

Результат Адрес: <http://> Страница

Текст (5000)

МИНИСТЕРСТВО РОССИИ
Образовательное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Тульский государственный университет»

Институт _____
Наименование института _____
Кафедра _____ Химики
(наименование выпускающей кафедры)

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Направление подготовки 04.03.01
Химия
Характеристика свойства метаноладополнители из безводного ацетата метилбензилов Метаноладополнители рСМ100

Студент группы 420461 _____ Васильева С.П.
(подпись, дата) (фамилия, инициалы)

Руководитель работы _____ Кузнецова Т.А.
(подпись, дата) (фамилия, инициалы)

Задающий кафедру _____ к.х.н. проф. Андреев В.В.
(подпись, дата) (фамилия, инициалы)

Оглавление

1. Введение	4
2. Литературный обзор	6
2.1. Общая характеристика метаноладополнителей	6
2.2. Структура фермента МДГ и механизм его взаимодействия с субстратом метанолом	8
2.3. Пост-трансляционная модификация метаноладополнителей	12
2.4. Кинетика ферментативных реакций	15
2.5. Активность ферментов и ее зависимость от концентрации субстрата	21
2.6. Методы определения активности ферментов	21
2.7. Методы определения активности ферментов	23
2.8. Методы определения активности ферментов	25
2.9. Методы определения активности ферментов	25
2.10. Методы определения активности ферментов	25
2.11. Методы определения активности ферментов	25
2.12. Методы определения активности ферментов	25
2.13. Методы определения активности ферментов	25
2.14. Методы определения активности ферментов	25
2.15. Методы определения активности ферментов	25
2.16. Методы определения активности ферментов	25
2.17. Методы определения активности ферментов	25
2.18. Методы определения активности ферментов	25
2.19. Методы определения активности ферментов	25
2.20. Методы определения активности ферментов	25
2.21. Методы определения активности ферментов	25
2.22. Методы определения активности ферментов	25
2.23. Методы определения активности ферментов	25
2.24. Методы определения активности ферментов	25
2.25. Методы определения активности ферментов	25
2.26. Методы определения активности ферментов	25
2.27. Методы определения активности ферментов	25
2.28. Методы определения активности ферментов	25
2.29. Методы определения активности ферментов	25
2.30. Методы определения активности ферментов	25
2.31. Методы определения активности ферментов	25
2.32. Методы определения активности ферментов	25
2.33. Методы определения активности ферментов	25
2.34. Методы определения активности ферментов	25
2.35. Методы определения активности ферментов	25
2.36. Методы определения активности ферментов	25
2.37. Методы определения активности ферментов	25
2.38. Методы определения активности ферментов	25
2.39. Методы определения активности ферментов	25
2.40. Методы определения активности ферментов	25
2.41. Методы определения активности ферментов	25
2.42. Методы определения активности ферментов	25
2.43. Методы определения активности ферментов	25
2.44. Методы определения активности ферментов	25
2.45. Методы определения активности ферментов	25
2.46. Методы определения активности ферментов	25
2.47. Методы определения активности ферментов	25
2.48. Методы определения активности ферментов	25
2.49. Методы определения активности ферментов	25
2.50. Методы определения активности ферментов	25
2.51. Методы определения активности ферментов	25
2.52. Методы определения активности ферментов	25
2.53. Методы определения активности ферментов	25
2.54. Методы определения активности ферментов	25
2.55. Методы определения активности ферментов	25
2.56. Методы определения активности ферментов	25
2.57. Методы определения активности ферментов	25
2.58. Методы определения активности ферментов	25
2.59. Методы определения активности ферментов	25
2.60. Методы определения активности ферментов	25
2.61. Методы определения активности ферментов	25
2.62. Методы определения активности ферментов	25
2.63. Методы определения активности ферментов	25
2.64. Методы определения активности ферментов	25
2.65. Методы определения активности ферментов	25
2.66. Методы определения активности ферментов	25
2.67. Методы определения активности ферментов	25
2.68. Методы определения активности ферментов	25
2.69. Методы определения активности ферментов	25
2.70. Методы определения активности ферментов	25
2.71. Методы определения активности ферментов	25
2.72. Методы определения активности ферментов	25
2.73. Методы определения активности ферментов	25
2.74. Методы определения активности ферментов	25
2.75. Методы определения активности ферментов	25
2.76. Методы определения активности ферментов	25
2.77. Методы определения активности ферментов	25
2.78. Методы определения активности ферментов	25
2.79. Методы определения активности ферментов	25
2.80. Методы определения активности ферментов	25
2.81. Методы определения активности ферментов	25
2.82. Методы определения активности ферментов	25
2.83. Методы определения активности ферментов	25
2.84. Методы определения активности ферментов	25
2.85. Методы определения активности ферментов	25
2.86. Методы определения активности ферментов	25
2.87. Методы определения активности ферментов	25
2.88. Методы определения активности ферментов	25
2.89. Методы определения активности ферментов	25
2.90. Методы определения активности ферментов	25
2.91. Методы определения активности ферментов	25
2.92. Методы определения активности ферментов	25
2.93. Методы определения активности ферментов	25
2.94. Методы определения активности ферментов	25
2.95. Методы определения активности ферментов	25
2.96. Методы определения активности ферментов	25
2.97. Методы определения активности ферментов	25
2.98. Методы определения активности ферментов	25
2.99. Методы определения активности ферментов	25
2.100. Методы определения активности ферментов	25

Журнал:

[12:05:03] **Успех** Найдено 1% совпадений по адресу: <https://students-library.com/library/read/83619-aktivirovaniye-i-ingibirovaniye-fermentov>

[12:05:19] **Успех** Найдено 1% совпадений по адресу: https://easyhelp.ru/subjects/reshenie_zadach_po_himii/ Исключить

[12:06:07] **Успех** Найдено 1% совпадений по адресу: <https://chem21.info/info/173726/>

[12:06:08] **Успех** Найдено 1% совпадений по адресу: <https://research-journal.org/chemistry/sravnenie-sposobov-immobilizatsii-proteoliticheskogo-kompleksa-bacillus-subtilis-na-xitozane/>

[12:06:32] **Успех** Найдено 1% совпадений по адресу: <https://chem21.info/info/104592/>

[12:30:30] Тип проверки: Стандартная

[12:30:30] **Уникальность текста 88%⁶** (Пропорционально подстановок: 0%)

Введите здесь текст для поиска

12:30 04.07.2020