

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
(код)
Химия
(наименование)

**Метанолдегидрогеназа из бесклеточного экстракта метиловых бактерий
M. extorquens pCM160 как биокатализатор амперометрического медиаторного
биосенсора**
(тема)

Студент группы 420461

(подпись, дата)

Улитина М.А.
(фамилия, инициалы)

Руководитель работы

(подпись, дата)

к.х.н., доц. Кузнецова Т.А.
(фамилия, инициалы)

Заведующий кафедрой

(подпись, дата)

к.х.н., проф. Алферов В.А.
(фамилия, инициалы)

Тула, 2020

Содержание

Введение	4
1. Литературный обзор	6
1.1. Аэробные метилотрофные бактерии.....	6
1.1.1. Род <i>Methylobacterium</i>	6
1.1.2. Характеристика PQQ – зависимой дегидрогеназы метилобактерий	8
1.1.3. Рекомбинантный штамм <i>Methylobacterium extorquens</i> pCM160	10
1.2. Ферментативная кинетика МДГ	11
1.3. Медиаторы в амперометрических биосенсорах	15
1.4. Биосенсоры на основе клеток метилотрофных бактерий	18
2. Экспериментальная часть	24
2.1. Используемые материалы	24
2.2. Культивирование метилотрофных бактерий	24
2.3. Получение бесклеточного экстракта	25
2.4. Спектрофотометрические измерения	25
2.4.1. Определение активности фермента	25
2.4.2. Количественное определение белка по методу Лоури	26
2.5. Электрохимические измерения	27
2.5.1. Медиаторный биосенсор	27
2.5.2. Формирование рабочего электрода	28
2.5.3. Электрохимические измерения окислительной активности бесклеточного экстракта метилобактерий	29
3. Результаты и обсуждение	31
3.1. Культивирование биомассы рекомбинантных метилобактерий <i>M.extorquens</i> pCM160.....	31
3.2. Количественное определение содержания белка в бесклеточном экстракте <i>M.extorquens</i> pCM160	31

3.3. Определение активности МДГ спектрофотометрическим методом	33
3.4. Определение субстратной специфичности бесклеточного экстракта <i>M.extorquens</i> pCM160 спектрофотометрическим методом	35
3.5. Определение кинетических параметров фермента МДГ в бесклеточном экстракте <i>M.extorquens</i> pCM160 по отношению к различным субстратам спектрофотометрическим методом	36
3.6. Бесклеточный экстракт <i>Methylobacterium extorquens</i> pCM160 как основа функционирования амперометрического медиаторного биосенсора	40
3.6.1. Селективность медиаторных сенсоров на основе бесклеточного экстракта рекомбинантных метиловых бактерий <i>M.extorquens</i> pCM160.....	42
3.6.2. Определение кинетических параметров фермента МДГ в бесклеточном экстракте <i>M.extorquens</i> pCM160 по отношению к различным субстратам амперометрическим методом	43
3.7. Сравнительный анализ результатов, полученных спектрофотометрическим и электрохимическим методами	50
Выводы	54
Список литературы	56
Приложение	60

Введение

В настоящее время одно из ключевых мест в промышленности занимает углеродное сырье, наиболее распространенным из которых является метанол. Он является достаточно доступным и сравнительно недорогим непищевым сырьем, который используется в качестве источника углерода для своеобразных организмов – метиловых бактерий, применяемых при проведении различных биотехнологических процессов.

Род *Methylobacterium* является одним из наиболее изученных [1] и играет большую роль в научных исследованиях, в частности, для мониторинга уровня токсичных соединений C_1 и их последующей биоремедиации [2].

Одной из особенностей метиловых бактерий является высокая концентрация в периплазматической мембране пирролохинолинхинон (PQQ) - зависимых дегидрогеназ. Основной из них является метанолдегидрогеназа (МДГ) – фермент, катализирующий окисление метанола до формальдегида, а также способный окислять первичные спирты и альдегиды, используя искусственные акцепторы электронов.

Клетки метиловых бактерий, их бесклеточный экстракт, фермент МДГ могут являться основой при создании биосенсорных систем мониторинга C_1 соединений в природных и антропогенно загрязненных экосистемах.

Работа с биосенсорами на основе микроорганизмов часто сопровождается внедрением биокатализаторов (ферментов, ускоряющих реакцию) в процесс анализа [3]. Ими могут быть, например, клетки метилотрофных бактерий, бесклеточный экстракт метиловых бактерий или фермент МДГ, входящий в их состав. Количество научной литературы, описывающей амперометрические биосенсоры на основе метиловых бактерий, фермента МДГ и медиаторов электронного транспорта невелико, поэтому применение бесклеточного экстракта метиловых бактерий в качестве биокатализаторов и разработка на его основе амперометрического медиаторного биосенсора является актуальной задачей.

Целью настоящей работы является изучение биокаталитических свойств фермента метанолдегидрогеназы из бесклеточного экстракта рекомбинантных метиловых бактерий *Methylobacterium extorquens* pCM160 как основы функционирования амперометрического медиаторного биосенсора.

Для выполнения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Получить бесклеточный экстракт рекомбинантных метиловых бактерий *M.extorquens* pCM160 с помощью ультразвукового дезинтегрирования и центрифугирования и установить концентрацию белка в нем;

2. Определить удельную активность фермента МДГ в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM160 в системе медиаторов феназинметасульфат (ФМС) + 2,6-дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ);

3. Изучить спектр окисляемых субстратов бесклеточного экстракта *M.extorquens* pCM160 спектрофотометрическим и амперометрическим методами;

4. Определить кинетические параметры фермента МДГ, содержащегося в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM160 по отношению к различным субстратам двумя методами – спектрофотометрическим и амперометрическим;

5. Провести сравнительный анализ результатов, полученных спектрофотометрическим и амперометрическим методами.

1. Литературный обзор

1.1. Аэробные метилотрофные бактерии

Аэробные метилотрофные бактерии в качестве источников углерода и энергии используют метан (метанотрофы), его окисленные или замещенные производные (метилобактерии). По способу питания различают факультативные и облигатные метилотрофные бактерии. Первые из них помимо одноуглеродных (C_1) соединений используют различные полиуглеродные (C_n) соединения, облигатные метилотрофы – только C_1 -соединения, тогда как ограниченно-факультативные могут расти на одном или нескольких C_n субстратах [2].

Метилотрофы обитают в водоемах и почвах различного типа, где идут процессы с образованием одноуглеродных соединений. Их выделение происходит из сточных вод, с гниющих растительных остатков, из рубца жвачных животных. Потребность в изучении метилотрофов вызвана не только особенностями их метаболизма, но и перспективами их использования в практической деятельности: метилотрофы характеризуются активным ростом, высокими выходами биомассы, большим содержанием полноценного белка в клетке; являются эффективными продуцентами различных веществ [4].

Субстратами, на которых могут расти аэробные метилобактерии, являются восстановленные C_1 -соединения – метанол, метилсульфиды и метилсульфонаты, галометаны, метилированные амины, широко распространенные во флоре и фауне. Метилотрофы участвуют в различных биогеохимических процессах биосферы, тем самым окисляя природные и антропогенные соединения с одним атомом углерода. Загрязнение окружающей среды порождает количество мест с высоким содержанием токсичных C_1 -соединений. Таким образом, изучение метилобактерий играет большую роль, так как они являются естественным природным барьером поступления C_1 -соединений в окружающую среду [5, 6].

1.1.1. Род *Methylobacterium*

Типовой вид – *Methylobacterium organophilum*. В 1983 году к роду были добавлены еще три вида: *M. rhodium* (прежнее название – *Pseudomonas rhodos*), *M. radiotolerans* (прежнее название – *Pseudomonas radiora*) и *M. mesophilicum* (прежнее название – *Pseudomonas mesophila*), и внесены уточнения в его описание.

В 1984 году был описан род *Protomonas*, включающий один вид *P. extorquens* (прежнее название – *Pseudomonas extorquens*). Однако в 1985 году представители *Protomonas* классифицированы и перенесены в род *Methylobacterium*. В 1988 году к роду *Methylobacterium* отнесены еще три вида: *M. rhodesianum*, *M. zatmanii* и *M. fujisawaense* [1].

Из промышленных сточных вод в Швейцарии был выделен штамм *Methylobacterium dichloromethanicum* DM 4, способный разлагать дихлорметан (метилен хлорид, CH_2Cl_2), который является антропогенным загрязнителем окружающей среды, так как примерно 80% эмиссии этого поллютанта в атмосферу обусловлено его использованием [7].

Сходством, объединяющим все виды *Methylobacterium*, является способность расти на одном или нескольких C_1 -соединениях, помимо метана, и прежде всего метанола, который является одним из основных летучих органических соединений выделяемых растениями. Таким образом, штаммы *Methylobacterium* часто встречаются в ассоциации с растениями, либо участвуют в симбиозах как эндофиты или как эпифиты на поверхности листьев [8].

Палочки 0,8–1,0 * 1,0–8,0 мкм, одиночные, иногда в розетках. В некоторых случаях клетки разветвленные или плеоморфные. Подвижные благодаря единственному полярному, субполярному или латеральному жгутику, хотя у некоторых штаммов подвижность слабо выражена. Клетки часто содержат крупные включения, окрашивающиеся Суданом, и иногда гранулы волютина. Грамотрицательные, однако, многие штаммы грамвариабельные. Для репрезентативных штаммов характерна многослойная клеточная стенка и тип цитратсинтазы, свойственный грамотрицательным бактериям. На глицерол-пептонномагаре колонии диаметром 1 – 3 мм, от бледно-розовых до ярких

оранжево-красных; на метанол-солевом агаре колонии более однородные, бледно-розового цвета. Пигмент нерастворимый, вероятно каротиноидный. При культивировании в жидкой среде без перемешивания растут в виде розового кольца или пленки на поверхности среды. Облигатные аэробы; каталазо- и оксидазоположительные (активность последнего фермента часто низкая). Хемоорганотрофы, факультативные метилотрофы и в ряде случаев факультативные метанотрофы. Способность некоторых штаммов использовать метан в качестве единственного источника углерода и энергии легко утрачивается, если их не поддерживать на неорганической среде в атмосфере метана.

Репрезентативные штаммы ассимилируют одноуглеродные соединения по гомоизоцитратному пути; при росте на сложных органических средах действует полный ЦТК. Выделены из почв, пыли, пресной воды, озерных осадков, с поверхности листьев, из клубеньков, зерен риса, воздуха и больничной среды. Оптимальная температура для роста 25 – 30 °С [1, 8].

1.1.2. Характеристика PQQ – зависимой дегидрогеназы метиловых бактерий

В процессе окисления метана у метилотрофов промежуточным веществом в большинстве случаев является метанол, образование которого катализируется ферментом метанмонооксигеназой. Окисление метанола сопровождается действием метанолдегидрогеназы (МДГ), который как и предыдущий фермент является неспецифическим, способный окислять широкий спектр субстратов [9].

Метанолдегидрогеназа – водорастворимый хинопротеин, участвующий в метаболизме небольших молекул, таких, как молекулы метанола и метана у метилотрофных бактерий. Этот процесс признан ключевым в обеспечении энергии для роста и развития метилотрофов [10].

Токсичность формальдегида, продукта окисления метанола, обуславливается нахождением фермента в периплазме.

Главным отличием кофактора PQQ (пирролохинолинхинон) от других окислительно-восстановительных кофакторов (флавины и никотинамиды) является

его каталитическое действие на рН-зависимую двухэлектронную, двухпротонную обратимую реакцию переноса электрона при относительно низких потенциалах [11].

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

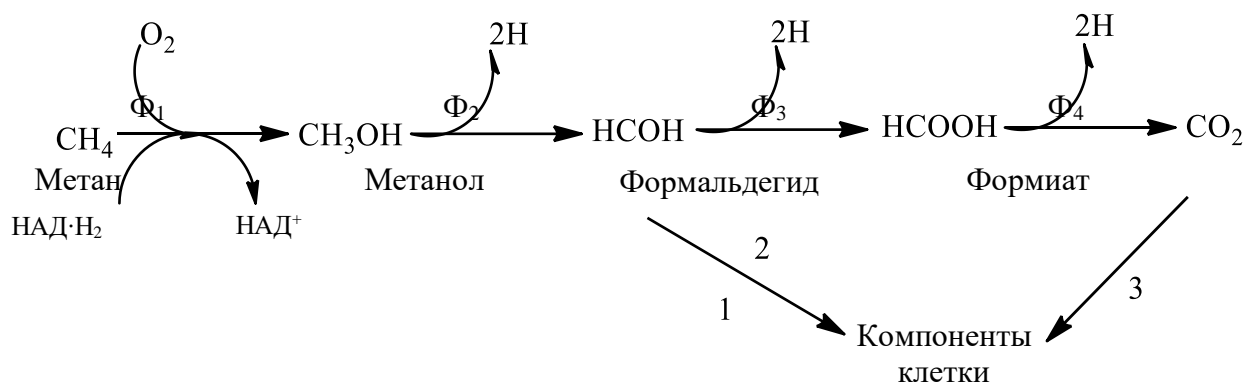


Рисунок 1. Схема окисления метана и связи энергетического и конструктивного метаболизма у метилотрофов

где Φ_1 -метанмонооксигеназа; Φ_2 -метанолдегидрогеназа; Φ_3 -формальдегиддегидрогеназа; Φ_4 -формиатдегидрогеназа.

Ассимиляционные циклы: 1 – рибулозомонофосфатный; 2 – сериновый; 3 – восстановительный пентозофосфатный.

Рентгеноструктурный анализ показал, что МДГ существует в виде определенного тетрамера $\alpha_2\beta_2$. В каждой α -субъединице молекулы нековалентно связаны редокс-коферментом пироллохинолинохиноном (рис.2) (PQQ, 4,5-дигидро-4,5-диоксо-1*H*-пирроло[2,3-*f*] хинолин-2,7,9-трикарбоновая кислота) и ионами Ca²⁺.

Ионы Ca²⁺, находящиеся в активном центре, выполняют одну из главных функций в механизме действия МДГ- поддержание PQQ в нужной конфигурации в активном центре.

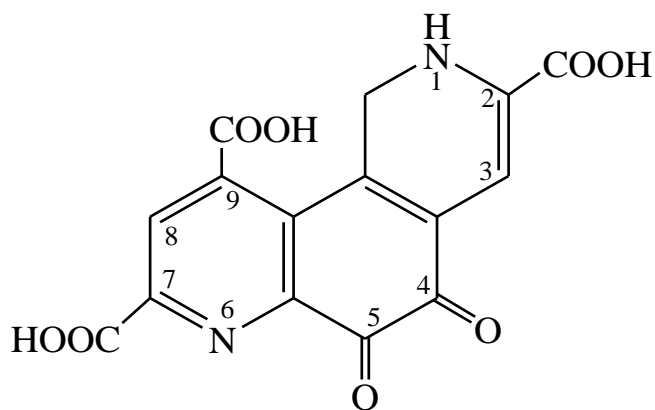


Рисунок 2. Структурная формула кофактора метанолдегидрогеназ – пирролохинолинхинона

Известно, что PQQ катализирует неферментные реакции при средних значениях pH и температуры. Наличие окислительных свойств PQQ и специфических ферментных реакций PQQ-зависимых дегидрогеназ дает возможность использовать их в качестве биокатализатора в высокоселективных и высокочувствительных электрохимических биосенсорах. [11, 12].

1.1.3. Рекомбинантный штамм *Methylobacterium extorquens* pCM160

В процессе разработки биосенсоров для анализа содержания спиртов и альдегидов используются клетки аэробных метиловобактерий. Эта возможность обуславливается уникальным метаболизмом данных клеток, а также наличием периплазматической локализации PQQ-дегидрогеназ, основной из которых является метанолдегидрогеназа (МДГ) [13].

Для очистки рекомбинантной МДГ в одну стадию методом металл-хелатной хроматографии был создан рекомбинантный штамм метиловобактерий *Methylobacterium extorquens* AM1 [13].

Для создания векторной системы использовалась плазмида pCM160, реплицирующаяся в метиловобактериях, что обеспечивает получение функционально-активного фермента МДГ.

Для создания генетической системы фрагмент ДНК, содержащий ген *mxaF*, был амплифицирован и клонирован в векторе pCM160, содержащем конститутивный промотор МДГ из *Methylobacterium extorquens* AM1 (Рис. 3).

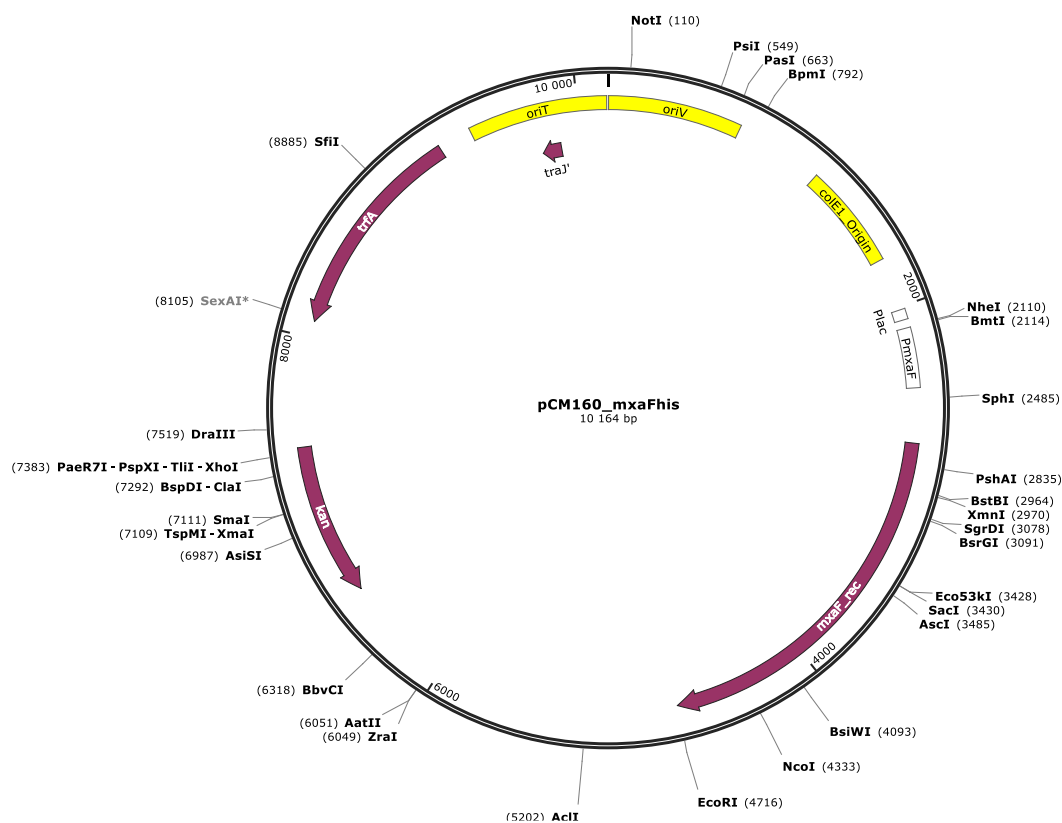


Рисунок 3. Карта вектора, несущего ген *mxaF* из *M. extorquens* AM1

Полученный вектор был внесен в клетки метиловых бактерий методом конъюгации. Так как плазмида содержит ген, кодирующий устойчивость к канамицину, рекомбинантный штамм культивировали на среде с этим антибиотиком.

Поскольку модифицированный штамм содержит нативную (природную) МДГ, а также рекомбинантный фермент, он обладает повышенным содержанием МДГ в целом.

1.2. Ферментативная кинетика

Кинетика ферментативных реакций – раздел биохимии, который изучает зависимость скорости химических реакций, катализируемых ферментами, от химической природы реагирующих веществ, а также от факторов окружающей среды.

Для измерения каталитической активности ферментов используют такие показатели, как скорость реакции или активность фермента. Скорость ферментативной реакции – мера каталитической активности фермента,

определяющаяся изменением количества молекул субстрата или продукта за единицу времени, ее обозначают как активность фермента.

Факторы, влияющие на активность фермента:

1. Концентрация солей. Большое количество 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.

2. Температура. Все ферменты работают в определенном диапазоне температур, специфичном для каждого организма. Повышение температуры обычно приводит к увеличению скорости реакции, но существует его предел, когда повышение температуры приводит к денатурации белка в результате разрушения слабой ионной и водородной связи, стабилизирующей третичную структуру активного центра фермента. Оптимальная температура для человеческих ферментов обычно составляет от 35 до 40 °С. Для большинства ферментов, участвующих в односубстратной каталитической реакции, зависимость ее скорости от температуры описывается колоколообразной кривой [14] (Рис. 4).

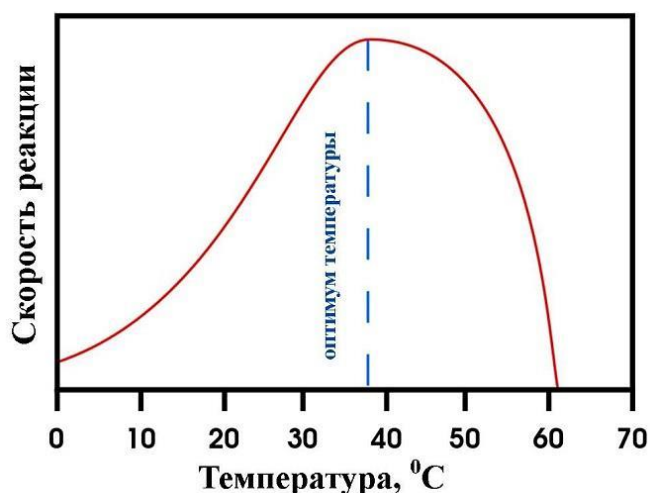


Рисунок 4. Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры

3. Влияния рН. Большинство ферментов чувствительны к изменению рН, что обусловлено степенью ионизации функциональных группировок в активном центре

фермента, а также изменением степени связывания фермента с субстратом. Для большинства ферментов оптимум pH находится в пределах от 6,0 до 8,0, а pH-зависимость скорости реакции также имеет колоколообразную форму (Рис. 5).

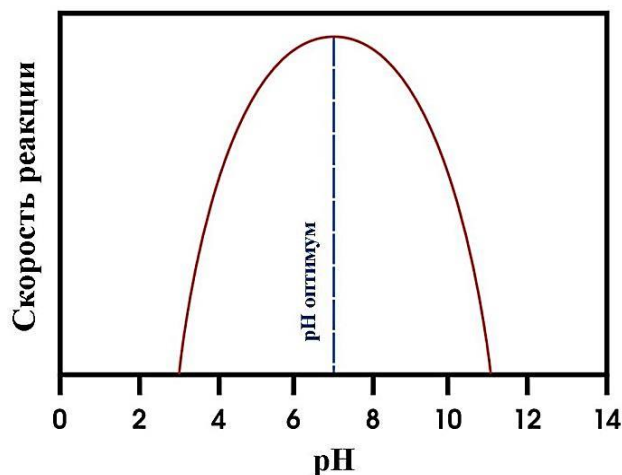


Рисунок 5. Зависимость скорости ферментативной реакции от pH

4. Концентрация субстрата. Увеличение концентрации субстрата увеличивает скорость реакции, но 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 (Рис. 6).

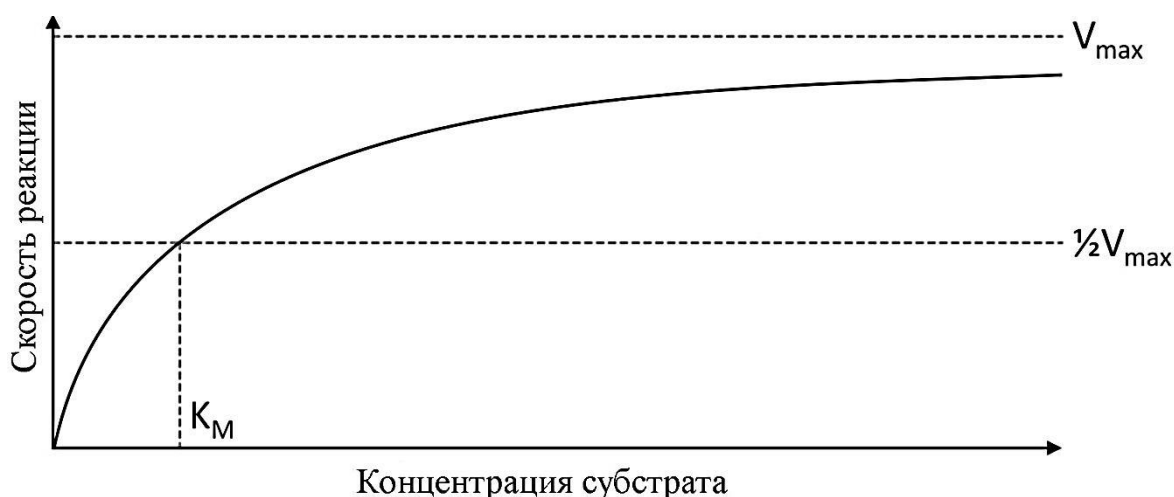
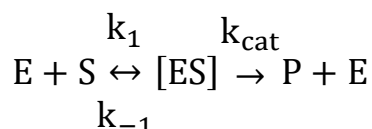


Рисунок 6. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата

Основным уравнением для моносубстратных ферментативных реакций является уравнение Михаэлиса-Ментен, которое связывает между собой начальную

скорость реакции, максимальную скорость реакции и исходную концентрацию субстрата.

Ферментативная реакция представляет собой двухэтапный процесс: связывание фермента (E) с субстратом (S) и образование фермент-субстратного комплекса (ES) с его последующим необратимым распадом для освобождения фермента и продукта (P):



В равновесной модели Михаэлиса-Ментена образование фермент-субстратного комплекса является наиболее быстрым процессом относительно скорости его распада. Поэтому предполагается, что первая стадия реакции будет равновесной. Константа равновесия для комплекса ES является мерой сродства фермента к субстрату и соответствует концентрации субстрата при $\frac{1}{2}V_{max}$:

$$K_s = \frac{[E] \times [S]}{[ES]}$$

Таким образом, чем ниже значение K_s , тем выше сродство фермента к субстрату. Скорость ферментативной реакции ограничена скоростью разрушения комплекса ES и поэтому может быть выражена следующим образом:

$$V = k_{cat} \times [ES]$$

где k_{cat} соответствует эффективной константе реакции первого порядка для распада комплекса ES на свободный фермент и продукт. Порядок реакции обычно определяется общей концентрацией фермента ($[E_T] = [E] + [ES]$):

$$\frac{V}{[E_T]} = \frac{k_{cat} \times [ES]}{[E] + [ES]}$$

где $[E]$ и $[ES]$ соответствуют концентрациям свободного фермента и фермент-субстратного комплекса. Замена $[ES]$ на выражение $[E] \times [S] / K_s$ приводит к уравнению:

$$\frac{V}{[E_T]} = \frac{k_{cat} \times ([E] \times [S] / K_s)}{[E] + ([E] \times [S] / K_s)}$$

Деление числителя и знаменателя на $[E]$, умножение числителя и знаменателя на K_S и перестановка дают известное выражение для скорости реакции, катализируемой ферментом:

$$V = \frac{k_{\text{cat}} \times [E_T] \times [S]}{K_S + [S]}$$

Путем определения V_{max} в качестве максимальной скорости реакции, равной $V_{\text{max}} = k_{\text{cat}} \times [E_T]$, данное уравнение может быть преобразовано в конечное уравнение Михаэлиса-Ментен:

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

Для стационарного состояния K_S может быть заменена на K_M . В большинстве случаев, связывание субстрата происходит быстрее, чем распад комплекса ES , а значит $K_S \approx K_M$, что делает модели эквивалентными [15].

V_{max} и K_M – главные кинетические характеристики эффективности фермента. V_{max} характеризует каталитическую активность 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 определяет 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 [16].

1.3. Медиаторы в амперометрических биосенсорах

Во втором поколении биосенсоров для передачи электронов используются искусственные акцепторы электронов - медиаторы.

Под медиатором понимается низкомолекулярная окислительно-восстановительная пара, которая переносит электроны от активного центра фермента к поверхности индикаторного электрода.

В данной работе использовались три вида медиатора электронного транспорта – феназинметасульфат (ФМС), 2,6 – дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ) и ферроцен.

Феназинметасульфат (ФМС) и 2,6 – дихлорфенолиндофенол как искусственные акцепторы электронов

Синтетический краситель феназинметасульфат является наиболее активным акцептором водорода для растворимого фермента, а также достаточно эффективным для флавопротеидных дегидрогеназ.

Феназинметасульфат, перенося электроны от активного центра фермента к поверхности электрода, катализирует данный процесс, что приводит к наименьшей затрате времени на химический анализ в целом. Такая активность ФМС, возможно, обусловлена его фотохимическим превращением в пиоцианин в присутствии кислорода (Рис. 7) [17, 18].

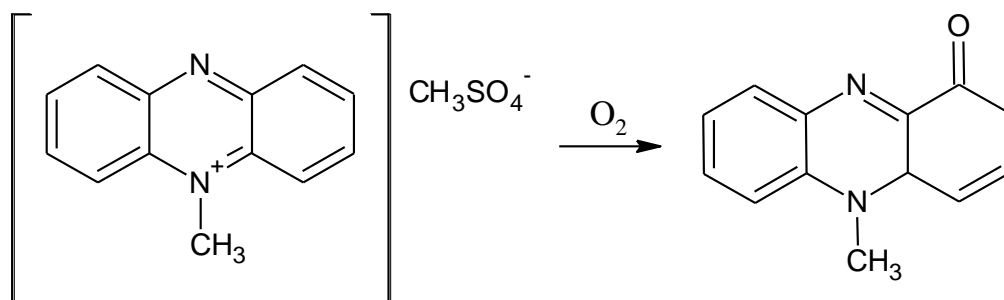


Рисунок 7. Превращение феназинметасульфата в пиоцианин

2,6-дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ) представляет собой химическое соединение, которое используется в качестве окислительно - восстановительного красителя (Рис. 8).

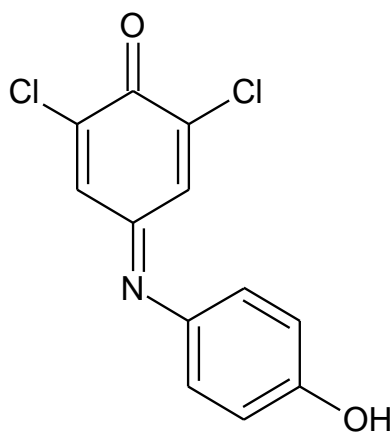


Рисунок 8. Структурная формула 2,6 – дихлорфенолиндофенола

Отличительной особенностью данного медиатора является то, что ДХФИФ может быть использован в качестве индикатора для витамина С. Если витамин С, который является хорошим восстановителем, присутствует, то синий краситель, который превращается розовый в кислых условиях, снижается до бесцветного соединения аскорбиновой кислоты. Эта реакция является окислительно - восстановительной реакцией: витамин С (аскорбиновая кислота) окисляется до дегидроаскорбиновой кислоты, а ДХФИФ восстанавливается до бесцветного соединения [19].

Ферроцен как медиатор электронного транспорта

В настоящее время ферроцен и его производные являются одним из самых эффективных и актуальных классов нерастворимых медиаторов электронного транспорта, применяемых на практике.

Это может быть обусловлено некоторыми достоинствами:

- 1) широкий спектр восстановительных потенциалов в зависимости от заместителей;
- 2) минимум побочных реакций, так как ферроцений-ионы генерируются при довольно низком потенциале (+0,22 В);
- 3) небольшое время отклика сенсора;
- 4) восстановленный ферроцен не реагирует с кислородом, поэтому сенсор не чувствителен к O_2 ;
- 5) независимость потенциала от рН и приемлемые методы синтеза различных производных [20, 21].

Ферроцен представляет собой π -ареновый комплекс переходного металла, который состоит из атома железа, зажатого двумя циклопентадиениловыми кольцами (Рис. 9).

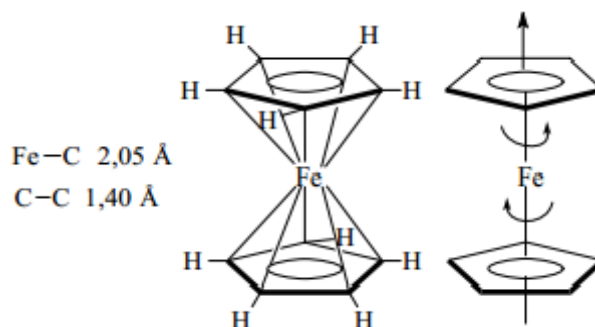
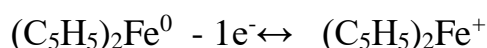


Рисунок 9. Структурная формула медиатора электронного транспорта - ферроцена

Стоит отметить, что использование электрохимических свойств ферроцена основано на легкости и обратимости протекания процессов одноэлектродного окисления или восстановления (редокс-процесс).



Система ферроцен – катион ферроцена в гомогенных условиях является одной из наиболее высокообратимых окислительно-восстановительных систем. Достаточно успешным оказалось использование этого свойства на практике. Во-первых, в качестве обратимых электродов в химических аналитических целях и, во-вторых, в качестве эффективного переносчика электрона в различных системах, прежде всего в биохимических исследованиях [22].

Исследование электрохимических свойств ферроцена и его производных показало, что в зависимости от природы заместителей и их положений редокс-потенциал изученных веществ составляет от 0,15 В до 0,60 В [23].

1.4. Биосенсоры на основе клеток метилотрофных бактерий

Клетки микроорганизмов, различных бактерий, а также их бесклеточный экстракт являются достаточно сложными объектами для исследований по сравнению с ферментами.

Одна из главных особенностей целых клеток заключается в том, что восстановители, образующиеся в метаболических процессах внутри клеток, изолированы от внешнего мира мембраной.

Поэтому контакт микробных клеток с электродом обычно выражается в переносе электрона через клеточную мембрану. Медиаторы электронного транспорта способны принимать электроны от восстановленных сайтов бактериальной клетки [24].

Метилробактерии имеют ряд преимуществ перед другими биохимическими компонентами биосенсоров. В первую очередь, они касаются сравнения характеристик ферментных и микробных сенсоров, поскольку метилробактерии чаще всего как источник определенной ферментативной активности.

К таким преимуществам относятся:

- исключение дорогостоящих операций выделения и очистки ферментных препаратов;
- повышение устойчивости ферментов в живых клетках, бесклеточном экстракте по сравнению с изолированными ферментами в силу сохранения привычного микроокружения и наличия систем репарации, включая биосинтез в процессе жизнедеятельности клеток и их деления;
- одновременное присутствие в клетке кофакторов, необходимых для функционирования фермента, а также систем их регистрации;
- возможность целенаправленной продукции требуемых ферментов с использованием генно-инженерных подходов;
- наличие простых и универсальных способов измерения активности ферментов по общим показателям жизнедеятельности клетки [25].

Помимо преимуществ использования метилробактерий в биосенсорах, данный биологический материал обладает следующими недостатками, такими как:

а) высокая приспособляемость и изменчивость метилробактерий могут снижать селективность и чувствительность микробных сенсоров, так как может окисляться не только подлежащий определению субстрат. Кроме того, клетки, лишенные какого-либо субстрата, могут «переключаться» на альтернативный путь метаболизма.

б) проблема в биологической устойчивости, что связано с необходимостью длительного хранения и поддержания активности метиловых бактерий и их бесклеточного экстракта в течение длительного времени [19].

При введении субстрата генерация электронов метилотрофными бактериями либо бесклеточным экстрактом приводит к увеличению концентрации восстановленного медиатора. Пределы чувствительности, точность и время отклика сенсора будут определяться величиной тока, получаемого при данных количествах метиловых бактерий и субстрата.

Эффективность преобразования сигнала зависит от скорости восстановления медиатора бактериальными клетками, бесклеточным экстрактом, которая достаточно различается для разных типов микроорганизмов и медиаторов [26].

Известно лишь небольшое количество разработанных биосенсоров на основе метилотрофных бактерий. Например, в работе Плехановой Ю.В. [27] клетки бактерий-деструкторов дихлорметана иммобилизовали на измерительной поверхности рН-чувствительного полевого транзистора как основы биосенсора для детекции дихлорметана. Разработан биосенсор на основе иммобилизованных в альгинате клеток *Nyphomicrobium* DM2 для определения концентрации дихлорметана и других дигалометанов.

Для количественного анализа спиртов были разработаны потенциометрические (на основе рН-чувствительных полевых транзисторов) и амперометрические (на основе чувствительного к O_2 или H_2O_2 электрода) биосенсоры (например, на основе клеток *H. Polymorpha*, чувствительным к низким концентрациям формальдегида).

Амперометрический медиаторный биосенсор на основе клеток *Methylobacterium dichloromethanicum* DM4 разработан для определения формальдегида в объектах окружающей среды и в биотехнологических производствах [28].

Так, например, в разработанном амперометрическом медиаторном биосенсоре для определения метанола клетки метиловых бактерий *M. tays* ВКМ В-2221 иммобилизовались на поверхность амперометрического медиаторного электрода, в качестве медиатора используется 2,5-дибром-п-бензохинон для более эффективного биоэлектрокаталитического окисления метанола [29].

Разработан модифицированный амперометрический МДГ-биосенсор, который является экономичным и простым в изготовлении, а также по некоторым аналитическим и метрологическим характеристикам превосходит другие биосенсоры для определения содержания метанола. Но затруднения в биосенсорном анализе возникают из-за наличия трудоемкой стадии очистки фермента. Альтернативным МДГ-биосенсору для определения метанола служит биосенсор на основе клеток *Methylobacterium nodulans* [30].

Недавно стало известно, что мембрана яичной скорлупы может быть использована в иммобилизации фермента и бактериальных клеток для построения ферментов и микробных биосенсоров. Мембрана яичной скорлупы, в основном, состоит из биологических молекул и белковых волокон. Сетчатая структура и газопроницаемые свойства мембраны яичной скорлупы обеспечивают превосходную микросреду для выживания клеток и поддержания их ферментативной активности. Сочетание наночастиц и биомолекул получили значительный интерес в области биотехнологии и биоаналитической химии, так как наночастицы, особенно золотые наночастицы (AuNPs) могут сыграть важную роль в повышении эффективности биосенсора, так как они имеют большую удельную поверхность и отличную биосовместимость. Клетки метиловых бактерий *M. organophilum* были иммобилизованы вместе с наночастицами AuNPs на поверхности мембраны яичной скорлупы для изготовления микробного биосенсора (на основе чувствительного к O₂ электрода) для определения содержания метанола. Разработанный биосенсор может быть подготовлен без каких-либо сложных процедур иммобилизации. Биосенсор на основе этих клеток показывает

хорошую воспроизводимость и высокую операционную стабильность [31].
 Механизм иммобилизации показан на рис.9.

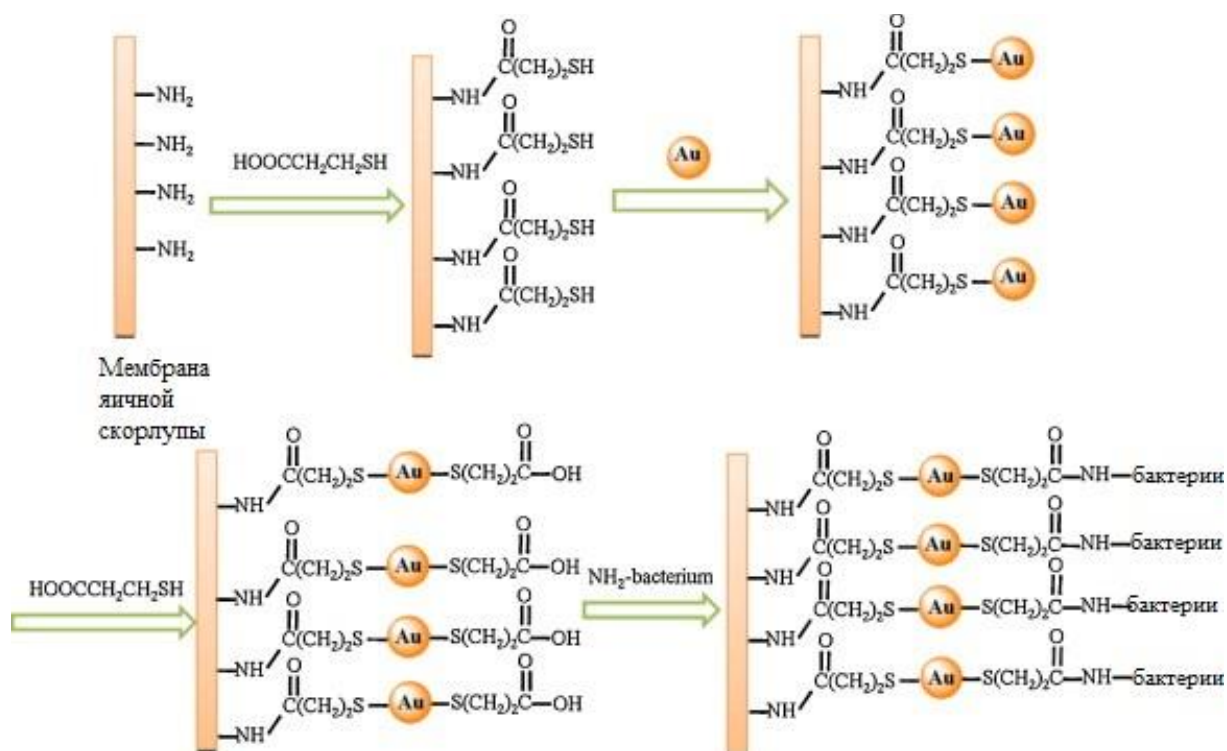


Рисунок 9. Механизм иммобилизации *Methylobacteriumorganophilum*с AuNPs на поверхности мембраны яичной скорлупы

Таким образом, использование целых клеток микроорганизмов в сочетании с медиаторами переноса электронов открывает широкие возможности для создания биосенсоров для детекции различных веществ [32].

В заключении литературного обзора стоит отметить, что биосенсоры на основе метиловых бактерий, их бесклеточного экстракта или фермента МДГ являются перспективным направлением в различных исследованиях, т.к. эти биокатализаторы содержат большое количество мембраннолокализованных дегидрогеназ легкодоступных для медиаторов электронного транспорта. Также нетрудно будет изучить биокаталитические свойства фермента МДГ из бесклеточного экстракта рекомбинантных метиловых бактерий *Methylobacterium extorquens* pCM160, так как факторы, влияющие на активность и стабильность фермента, легко контролировать в процессе исследования.

Метилотрофные микроорганизмы представляют значительный интерес как потенциальные объекты биотехнологии: для производства белка, ферментов, липидов, стероидов, гормонов, антиоксидантов, пигментов, полисахаридов, факторов транспорта железа, первичных и вторичных метаболитов [32].

2. Экспериментальная часть

2.1. Используемые материалы

В работе использовали клетки рекомбинантных метиловых бактерий *Methylobacterium extorquens* pCM 160.

2.2. Культивирование метилотрофных бактерий

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

Таблица 1. 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 (7 суток), 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 аэрацию на шейкере при 160 об/мин.

Биомассу отбирали на 7 сутки и выделяли бесклеточный экстракт.

2.3. Получение бесклеточного экстракта

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. Клеточные мембраны отделяли центрифугированием при 30000 g в течение 30 мин при 4°C.

2.4. Спектрофотометрические измерения

2.4.1. Определение активности фермента

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

Таблица 2. 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	0,087 мМ	0,05
CH ₃ OH		0,4 М	10 мМ	0,05
Экстракт		-	-	0,05

Смесь, содержащую буфер, нагретый до 30°C, 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 следующей формуле:

$$\text{Активность} \left(\frac{\text{Ед}}{\text{мл}} \right) = \frac{(\Delta\text{ОП}_{600/\text{мин опыт}} - \Delta\text{ОП}_{600/\text{мин контроль}}) \times V_{\text{реакц смеси, мл}} \times f}{19 \times V_{\text{образца, мл}}}$$

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

где: f – коэффициент разбавления исходного раствора препарата фермента; 19 – коэффициент миллимолярной экстинкции ДХФИФ при 600 нм, рН 9,0; $V_{\text{образца}}$ – объем образца в мл; C – концентрация белка в исходном растворе, мг/мл.

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

Показатели активность, суммарной активности и удельной активности рассчитывали с помощью программы MS Excel 2007 и SigmaPlot 11.0 [34].

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

2.4.2. Количественное определение белка по методу Лоури

Измерения проводили посредством построения градуировочного графика по стандартным растворам БСА (200мкг/мл) (Табл. 3). 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.

Одновременно готовили пробирку с неизвестной концентрацией, разбавленной в 100 и в 40 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 37°C 30 минут для развития окраски.

Таблица 3. Данные для построения градуировочного графика с растворами белка разной концентрации

№	Станд. р-р БСА (200 мкг/мл), мл	Дистиллированная 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

Фотометрировали на спектрофотометре ПЭ-5400УФ (ЭКРОС, Россия) при длине волны 600 нм. По результатам измерения построили градуировочный график и определили содержание белка в каждой пробе [35].

2.5. Электрохимические измерения

2.5.1. Медиаторный биосенсор

Медиаторный биосенсор представлял собой двухэлектродную систему, в которой электродом сравнения служил хлорсеребряный электрод, а рабочим – модифицированный графито-пастовый электрод (Рис.10). Биоматериал наносился на поверхность рабочего электрода и фиксировался диализной мембраной (размер пор 14 кДа) «Sigma» (США).

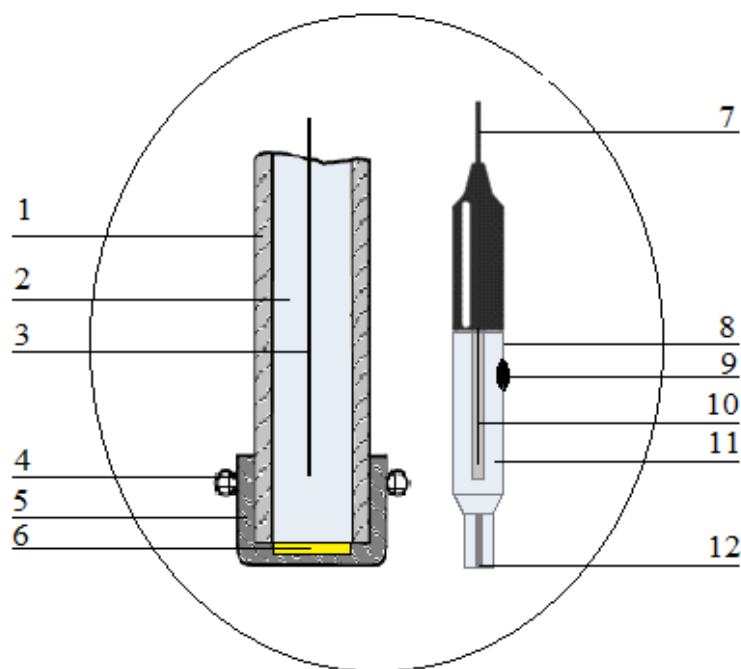


Рисунок 10. Схематическое изображение рабочего электрода и электрода сравнения

где 1 – пластиковая трубка, 2 – графитовая паста, 3 – платиновая проволока, 4 – пластиковое кольцо, 5 – диализная мембрана, 6 – слой биоматериала, 7 – контакт, 8 – стеклянный корпус, 9 – отверстие для ввода раствора KCl, 10 – серебряная проволока, 11 – раствор KCl (насыщенный), 12 – асбестовое волокно, обеспечивающее контакт с анализируемым раствором.

2.5.2. Формирование рабочего электрода

Рабочий графито-пастовый электрод готовили, наполняя графитовой пастой «графитовая пудра - минеральное масло» пластиковый шприц. Носик шприца содержал графитовую пасту с добавлением медиатора ферроцена «Aldrich» (Германия). Концентрация медиатора в пасте составляет 10% по массе.

Графитовую пасту готовили смешиванием в агатовой ступке 100 мг графитовой пудры «Fluka» (Германия) с необходимым количеством медиатора и 20 мм³ парафинового масла «Fluka» (Германия).

Шприц содержал платиновую проволоку для электрического контакта с частицами графита.

В качестве биоматериала для медиаторного электрода использовали бесклеточный экстракт рекомбинантных метиловых бактерий *M. extorquens* pCM160. На поверхность электрода иммобилизовали 20 мкл бесклеточного экстракта подсушивали на сушилке без нагревания в течение 3 мин и досушивали при комнатной температуре 15 минут. Для более прочной иммобилизации клеток использовали диализную мембрану (размер пор 14 кДа) «Sigma» (США), которую закрепляли на поверхности электрода с помощью пластикового кольца.

2.5.3. Электрохимические измерения окислительной активности бесклеточного экстракта метиловых бактерий

Электрохимические измерения проводили при помощи гальванопотенциостата «IPC-micro», интегрированного с ПК (Рис.11).

Для измерений электроды (аналитический, содержащий иммобилизованные биокатализаторы и хлорсеребряный электрод) погружали в электролитическую ячейку объемом 4 мл, содержащую раствор фосфатного буфера с добавлением хлорида аммония (15мМ), рН=8,0. Измерения выполняли при 20°C и постоянном перемешивании (200 об/мин).

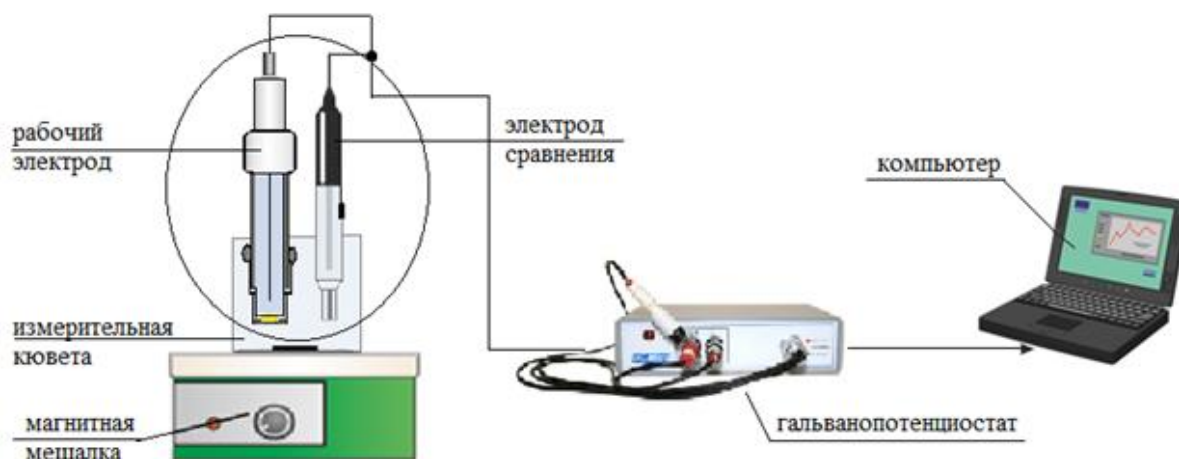


Рисунок 11. Схема амперометрического медиаторного биосенсора [36]

Зависимость силы тока медиаторного электрода от времени регистрировали при постоянном потенциале ($E=250$ мВ). В качестве исследуемых растворов использовали метанол и другие субстраты. После установления постоянного уровня тока в ячейку автоматической пипеткой («Ленпипет», Россия) вводили

необходимый объем субстрата (5-50 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл, 1000-5000 мкл). После каждого добавления субстрата производили промывку ячейки фосфатным буфером. Измеряемым параметром сигнала сенсора в процессе каталитического окисления субстрата являлась амплитуда изменения тока, определяемая как разность между конечным и начальным значениями токов до и после введения субстрата в измерительную кювету.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью компьютерной программы SigmaPlot и MicrosoftOfficeExcel.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Культивирование биомассы рекомбинантных метиловобактерий *M.extorquens* pCM160

В ходе эксперимента нами выращены колонии *M.extorquens* pCM160 на агаризированной среде (Рис.12) и затем пересажены на жидкую среду Канада.

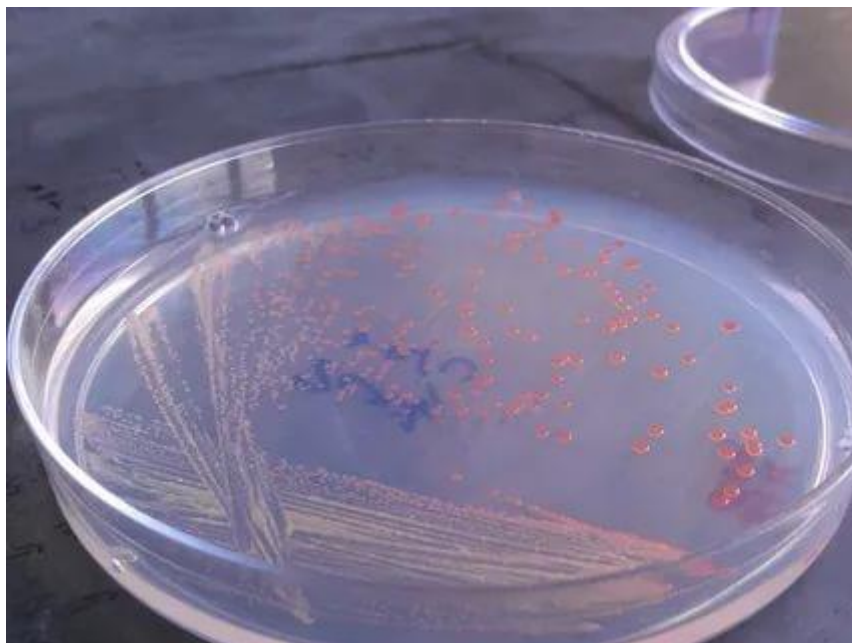


Рисунок 12. Метилотрофные бактерии *M.extorquens* pCM160 на агаризованной среде

Выделение бесклеточного экстракта проводили путем разрушения клеточной массы на ультразвуковом дезинтеграторе, а клеточную структуру отделяли с помощью центрифугирования. Таким образом, масса бесклеточного экстракта метиловобактерий *M.extorquens* pCM160 составила 5,6 г. Определение активности фермента МДГ, содержащегося в бесклеточном экстракте, проводили на 7 сутки с начала посева метиловобактерий *M.extorquens* pCM160. Данный период был выбран в результате мониторинга предыдущих экспериментов по изучению активности на разных стадиях роста для данного штамма, из которых видно, что этот промежуток времени наиболее оптимален.

3.2. Количественное определение содержания белка в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM160

Определение концентрации белка проводили по методу Лоури. Был построен градуировочный график (Рис. 13) в пределах концентраций от 10 до 200 мкг/мл.

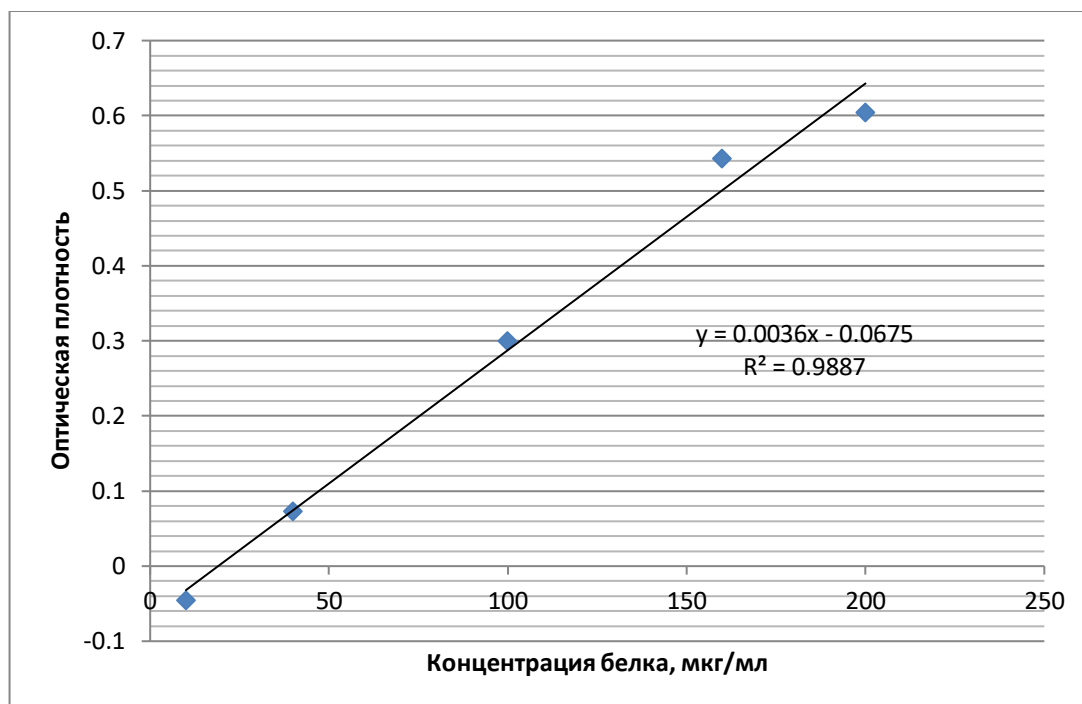


Рисунок 13. Градуировочная зависимость оптической плотности от концентрации белка

Далее опытным путем подбирали разбавление анализируемого бесклеточного экстракта *M. extorquens* рСМ160 неизвестной концентрации, чтобы содержание белка находилось в пределах концентраций градуировочного графика. Таким образом, анализируемый образец был разбавлен в 100 раз.

В табл. 4 указаны концентрация белка в кювете, исходная концентрация белка и посчитан суммарный белок с помощью формулы:

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

где V – общий объем образца, мл.

Таблица 4. Определение концентрации белка в анализируемых образцах

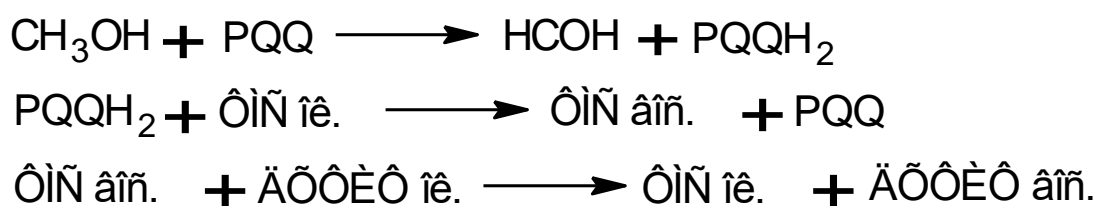
Концентрация белка в кювете, мкг/мл	Исходная концентрация белка, мг/мл	Суммарный белок, мг
110,420	11,042	28,378

Стоит отметить, что значение исходной концентрации белка очень близко к значению концентрации белка, рассчитанной в экстракте *M.nodulans* после разрушения (11,1 мг/мл) [37] и немного различается с концентрацией в экстракте *M.extorquens* (8,96 мг/мл) [12]. Исходя из имеющихся данных, можно сделать вывод об эффективности разрушения метиловобактерий, а именно – чем больше концентрация белка в бесклеточном экстракте, тем выше эффективность разрушения метиловобактерий.

Таким образом, полученное значение исходной концентрации белка (11,042 мг/мл) было использовано для расчета активности фермента.

3.3. Определение активности МДГ спектрофотометрическим методом

В клетках метиловобактерий МДГ катализирует окисление метанола, передавая электроны на природный акцептор – цитохром С. Также известно, что *in vitro* МДГ проявляет активность с искусственными акцепторами электронов, такими как ФМС. Таким образом, эффективный перенос электронов от фермента на электрод возможен при использовании природных или синтетических переносчиков электронов. В качестве переносчиков электронов использовали систему – ФМС+ДХФИФ:



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 [38].

Активность МДГ определяли спектрофотометрически при 600 нм, 30°C и толщине кюветы 1 см на приборе ПЭ-5400УФ (ЭКРОС, Россия). Для этого измеряли

оптическую плотность холостого опыта и по расчетным формулам определяли активность, удельную активность и суммарную активность МДГ в образце (Табл.5). Аппроксимацию экспериментальных данных проводили с помощью программы MS Excel 2007 и SigmaPlot 11.0. График кинетической зависимости оптической плотности от времени выглядит следующим образом (Рис. 14):

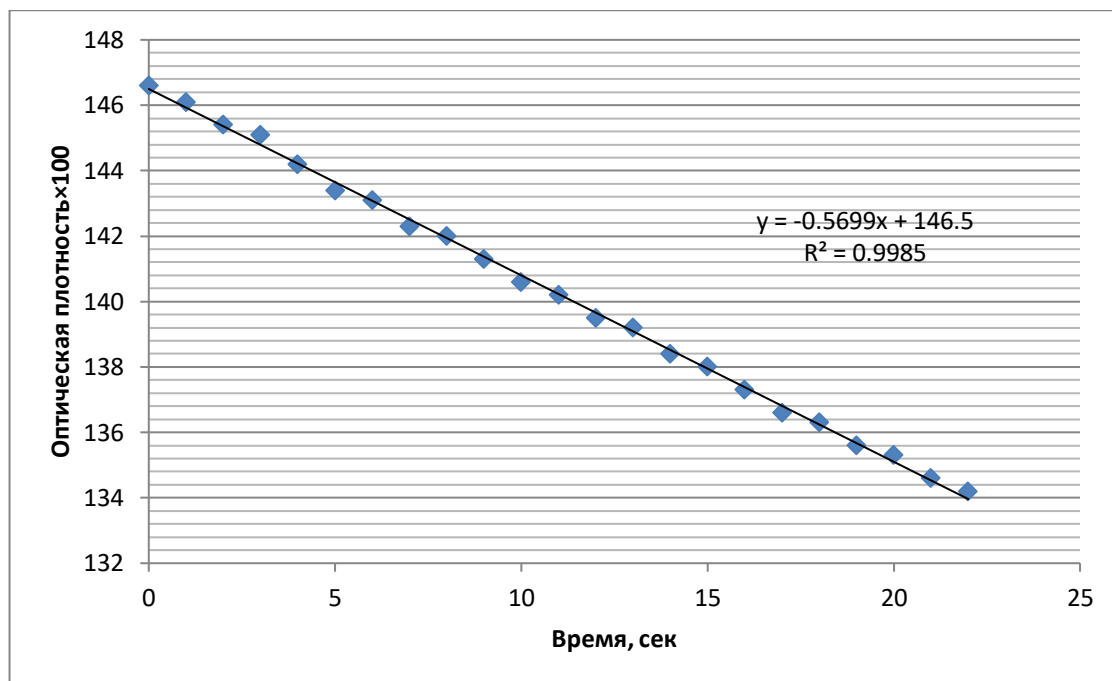


Рисунок 14. Зависимость оптической плотности от времени при проведении реакции для определения активности МДГ (600 нм)

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 восстановленная форма ДХФИФ бесцветна.

Таблица 5

Активность МДГ, Ед/мл	Удельная активность МДГ, Ед/мг белка	Суммарная активность МДГ, Ед
1,603	0,145	4,12

Значение удельной активности МДГ (0,145 Ед/мг белка) соответствует литературным данным (0,2±0,7 Ед/мг белка [33]; 3,82 Ед/мг белка [37]), следовательно, фермент МДГ активен, а бесклеточный экстракт, который его содержит, является рабочим и может использоваться в дальнейших экспериментах.

3.4. Определение субстратной специфичности бесклеточного экстракта *M.extorquens* pCM160 спектрофотометрическим методом

Специфичность бесклеточного экстракта оценивали по величине удельной активности фермента к определенному субстрату. В качестве субстратов использовали формальдегид, карбоновые кислоты и спирты различного строения в концентрациях 0,1 моль/л (Табл.6).

Для бесклеточного экстракта метиловых бактерий *M.extorquens* pCM160 построили диаграмму зависимости удельная активность в Ед/мг белка для различных субстратов (Табл.7) (Рис. 15).

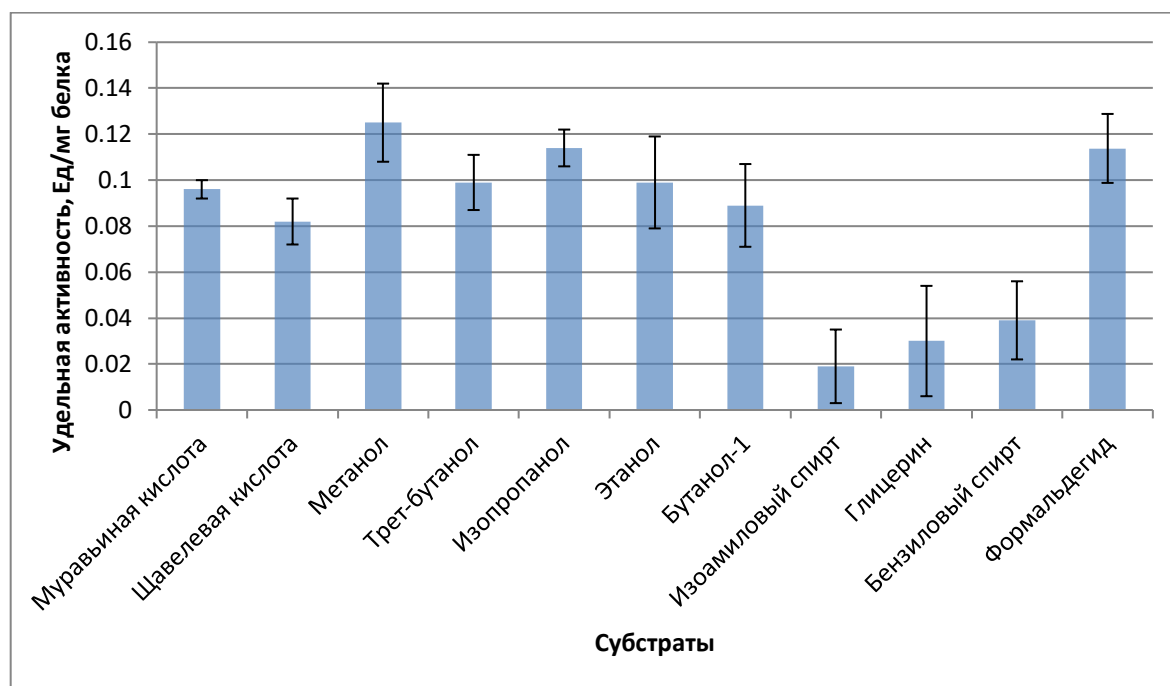


Рисунок 15. Субстратная специфичность бесклеточного экстракта *M.extorquens* pCM160

Основным ферментом, который присутствует в бесклеточном экстракте метилотрофных бактерий *M.extorquens* pCM160, является МДГ, что видно из полученных результатов - максимальная каталитическая активность наблюдается к

метанола, что согласуется с литературными данными [23]. Но данный бесклеточный экстракт содержит в своем составе и другие ферменты, например, формиатдегидрогеназа, поэтому окислительная активность бесклеточного экстракта проявляется к другим субстратам. Так как метанолдегидрогеназа является невысокоспецифичным ферментом, способная окислять, кроме метанола, и другие спирты первичные спирты (C_1-C_5), но слабо взаимодействует с их вторичными и третичными изомерами [23], поэтому окислительная активность фермента относительно изопропанола и трет-бутанола достаточно ниже, чем активность относительно метанола. Для дальнейшего определения кинетических параметров ферментативной реакции были использованы муравьиная кислота, щавелевая кислота, метанол, трет-бутанол и изопропанол, так как ответы на эти субстраты были достаточно высоки, карбоновые кислоты ранее не использовались в подобных экспериментах, а также количество данных субстратов было достаточно для проведения исследований.

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

Для определения кинетических параметров фермента МДГ по отношению к разным субстратам изучали зависимость удельной активности МДГ от концентрации субстратов – муравьиной кислоты (Табл. 8, 9), щавелевой кислоты (Табл. 10, 11), метанола (Табл. 12, 13), трет-бутанола (Табл. 14, 15), изопропанола (Табл. 16, 17).

По полученным данным (Табл. 8-17) построили графики зависимости удельной активности фермента МДГ от концентрации субстратов (Рис. 16-20).

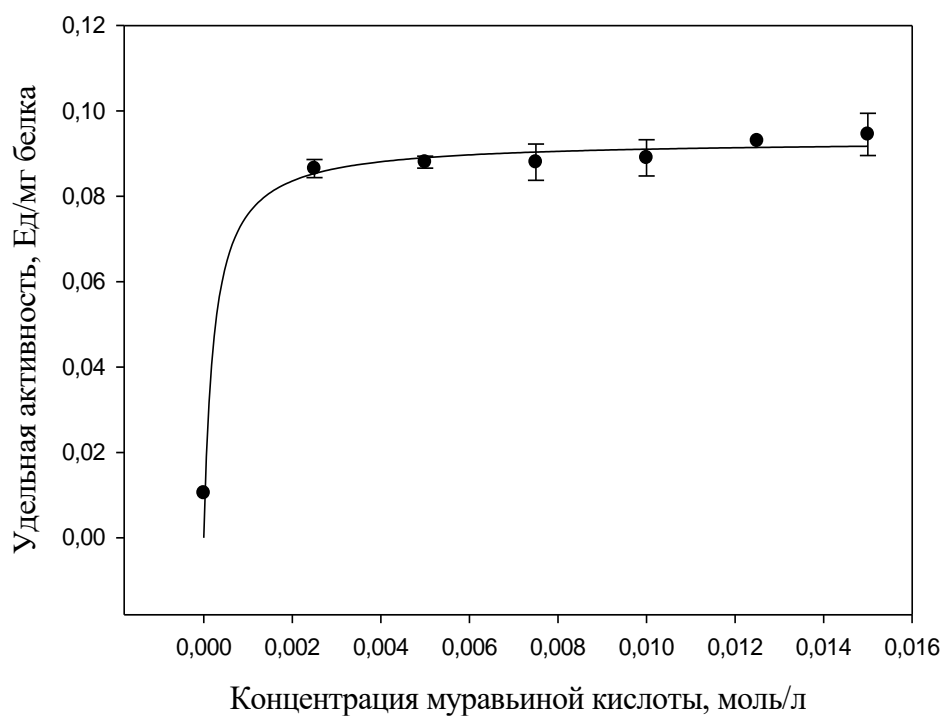


Рисунок 16. График зависимости удельной активности МДГ от концентрации муравьиной кислоты

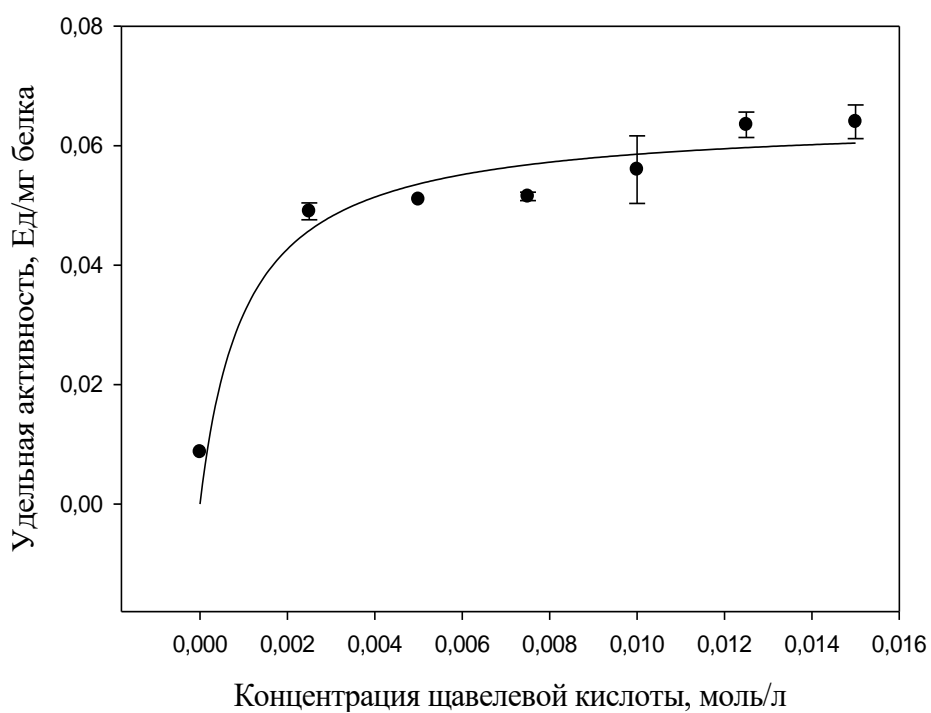


Рисунок 17. График зависимости удельной активности МДГ от концентрации щавелевой кислоты

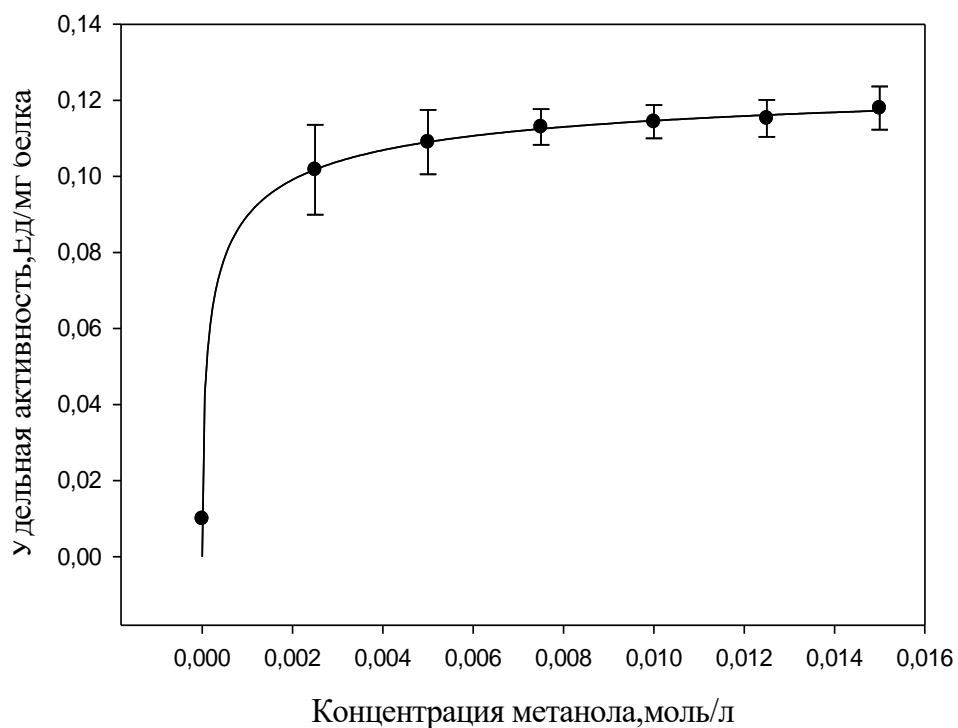


Рисунок 18. График зависимости удельной активности МДГ от концентрации метанола

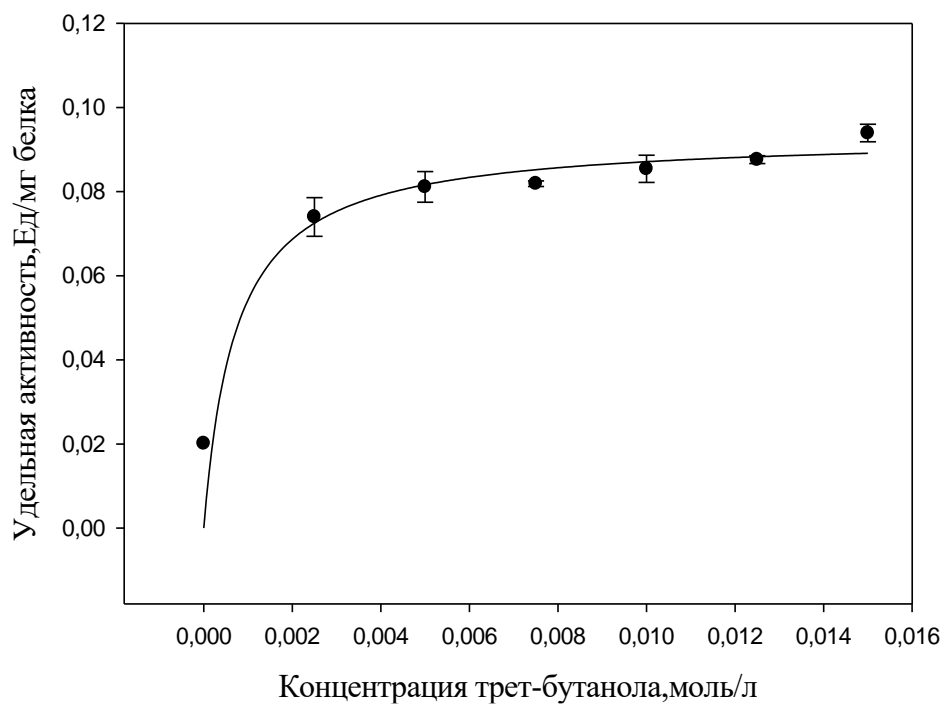


Рисунок 19. График зависимости удельной активности МДГ от концентрации трет-бутанола

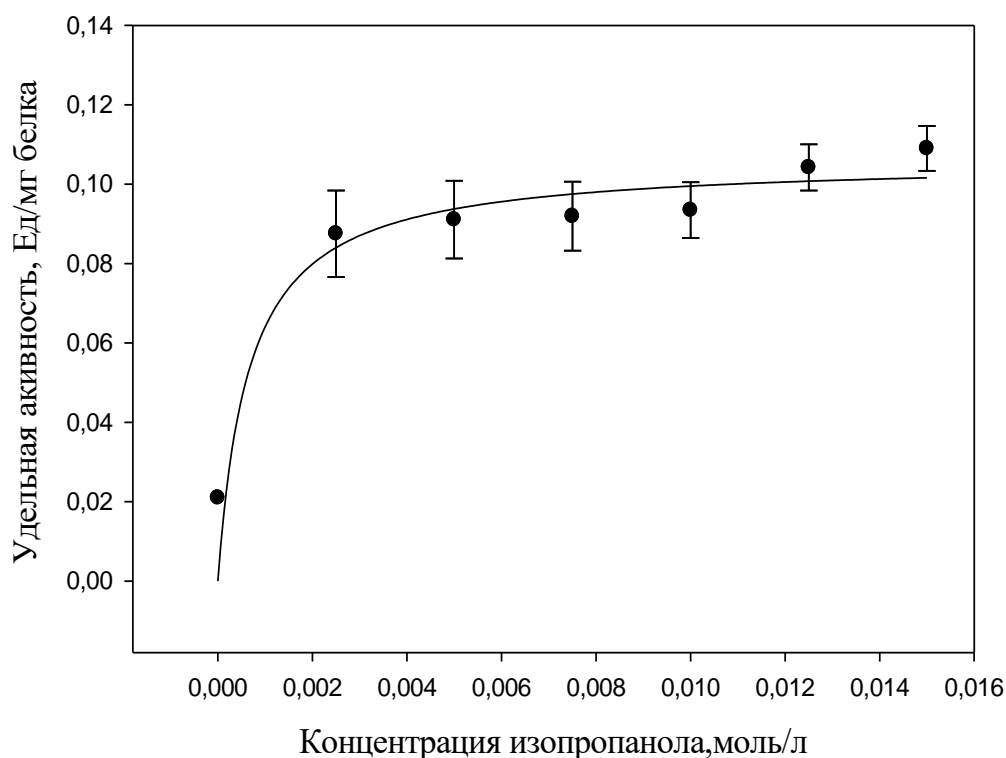


Рисунок 20. График зависимости удельной активности МДГ от концентрации изопропанола

Для описания кинетики ферментативных реакций в гомогенных условиях используют гиперболическое уравнение Михаэлиса-Ментен с двумя параметрами. Если же калибровочные зависимости имеют сигмоидальный характер, их аппроксимируют уравнением Хилла с тремя параметрами для описания кинетики аллостерических ферментов.

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, моль/л.

Экспериментальные данные аппроксимировали с помощью уравнения Михаэлиса-Ментен и получили следующие результаты, представленные в табл.18.

Таблица 18. Параметры уравнения Михаэлиса-Ментен для бесклеточного экстракта *M.extorquens* pCM160 по отношению к различным субстратам

Параметр	V_{\max} , Ед/мг белка	K_M , ммоль/л	R^2
Муравьиная кислота	0,093±0,002	0,2±0,1	0,9813
Щавелевая кислота	0,065±0,003	1,0±0,4	0,9428
Метанол	0,100±0,003	0,4±0,2	0,9455
Трет-бутанол	0,090±0,004	0,7±0,3	0,9049
Изопропанол	0,100±0,006	0,5±0,4	0,8983

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 табл.18, видно, что наименьшая K_M характерна для муравьиной кислоты (0,2±0,1 ммоль/л). Это объясняется тем, что в качестве биокатализатора используется не чистый фермент МДГ рекомбинантных метиловых бактерий *M.extorquens* pCM160, для которого характерна наименьшая K_M к метанолу [23], а их бесклеточный экстракт, в котором, кроме МДГ, находятся и другие ферменты (например, формиатдегидрогеназа).

3.6. Бесклеточный экстракт *Methylobacterium extorquens* pCM160 как основа функционирования амперометрического медиаторного биосенсора

Количественную оценку окислительной активности бесклеточного экстракта изучали электрохимическим методом определения интенсивности биоэлектрокаталитического окисления субстратов в присутствии медиатора электронного транспорта ферроцена. Амперометрический медиаторный биосенсор представлял собой двухэлектродную систему, в которой электродом сравнения служил хлорсеребряный электрод, а рабочим электродом - графито-пастовый

электрод, содержащий пасту с медиатором – ферроценом и иммобилизованным на поверхности биокатализатором.

На медиаторный электрод подавали положительный потенциал относительно хлорсеребряного электрода сравнения. За ответ сенсора принимали изменение силы тока ΔI (нА) – разность между базовой и стационарной величинами тока. На рис. 21 представлен классический вид отклика биосенсора на метанол в присутствии медиатора– ферроцена. Через 60 секунд после добавления субстрата ток достигал стационарного значения, а при удалении субстрата помывкой принимал исходное значение.

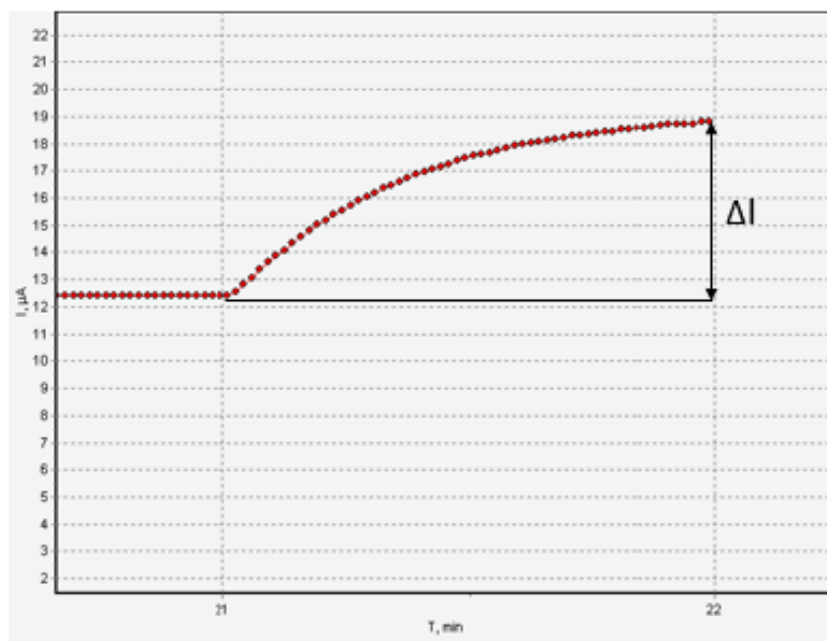
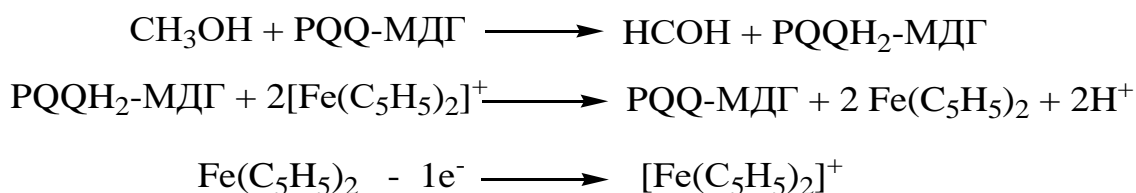


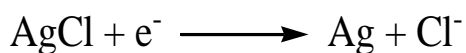
Рисунок 21. Типичный вид отклика биосенсора, модифицированного ферроценом для бесклеточного экстракта *M. extorquens* рСМ 160, на метанол (5 мМ)

Процесс, который протекает при электрокаталитическом окислении метанола под действием фермента МДГ, содержащей кофактор PQQ в присутствии ферроцена, может быть представлен в следующем виде:

Анод (подаётся потенциал 250 мВ относительно электрода сравнения):



Катод:



МДГ катализирует реакцию по механизму «пинг-понг» с последовательным восстановлением RQQ метанолом и выделением формальдегида. При этом ферроцений-ионы восстанавливаются до ферроцена, а затем окисляются опять до ферроцений-иона. Последний вновь вступает в новый цикл взаимодействий.

3.6.1. Селективность медиаторных сенсоров на основе бесклеточного экстракта рекомбинантных метиловых бактерий *M.extorquens* pCM160

Селективность биосенсорного анализа определяется специфичностью биологического материала, а именно бесклеточного экстракта. Для ее изучения оценивали величину откликов (в нА) сенсора на одну и ту же концентрацию субстрата (Рис. 22). В качестве субстратов использовали те же субстраты, что и при спектрофотометрическом определении (Табл. 6).

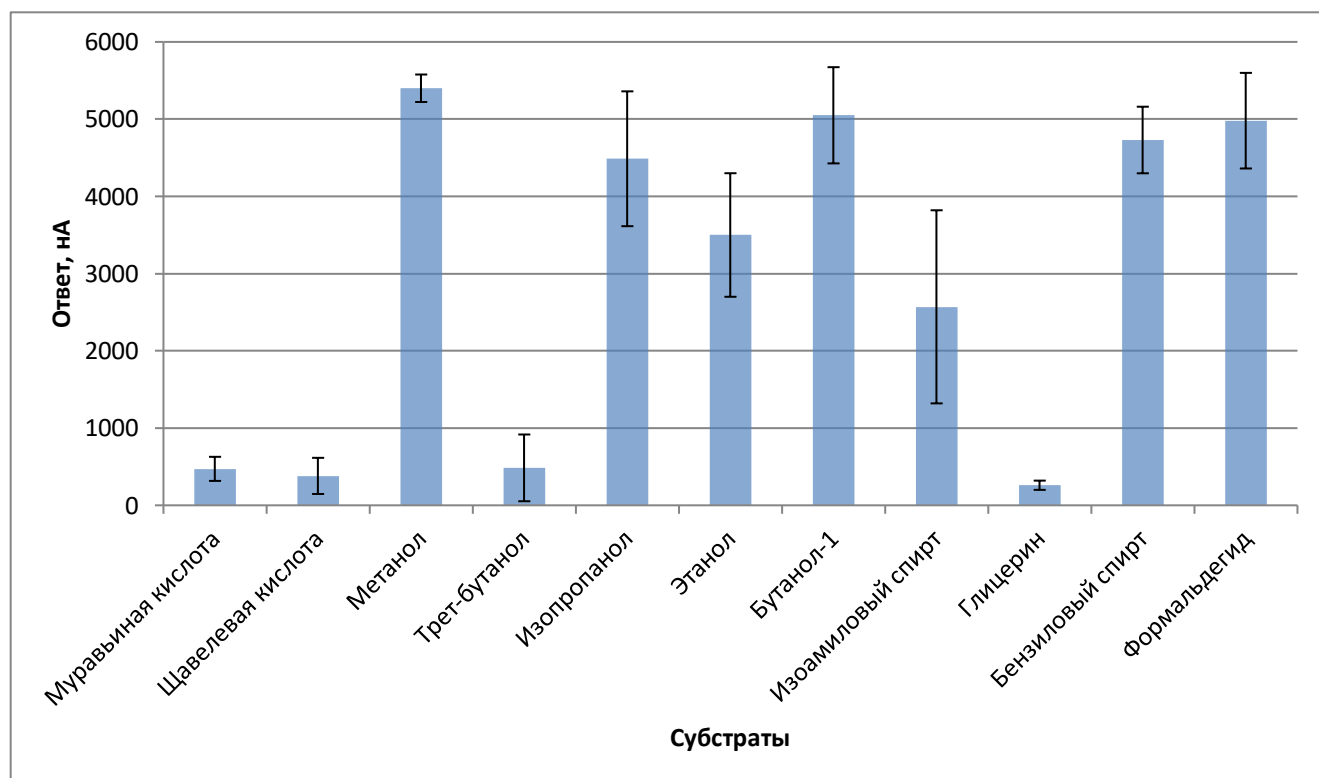


Рисунок 22. Субстратная специфичность бесклеточного экстракта *M.extorquens* pCM160 в присутствии медиатора ферроцена.

Исследуемый бесклеточный экстракт проявляет наибольшую окислительную активность по отношению к метанолу, что согласуется с литературными данными [23].

Также на рис. 22 наблюдается снижение каталитической активности фермента с увеличением длины углеродной цепи субстрата, что соответствует литературному источнику [23]. Окислительная активность МДГ к формальдегиду достаточно высока, так как МДГ способна окислять данный субстрат [23]. К глицерину, муравьиной и щавелевой кислотам значение активности слишком мало, что может быть обусловлено неспособностью ферментных систем проявлять активность по отношению к данным субстратам в присутствии медиатора ферроцена.

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

Часто возникает потребность в калибровке биосенсора. Причиной этому служит получение воспроизводимых результатов в процессе проведения различных исследований. В качестве субстратов использовали муравьиную кислоту, щавелевую кислоту, метанол, трет-бутанол и изопропанол.

Экспериментальные данные аппроксимировали с помощью уравнения Михаэлиса-Ментен (Рис. 23-27).

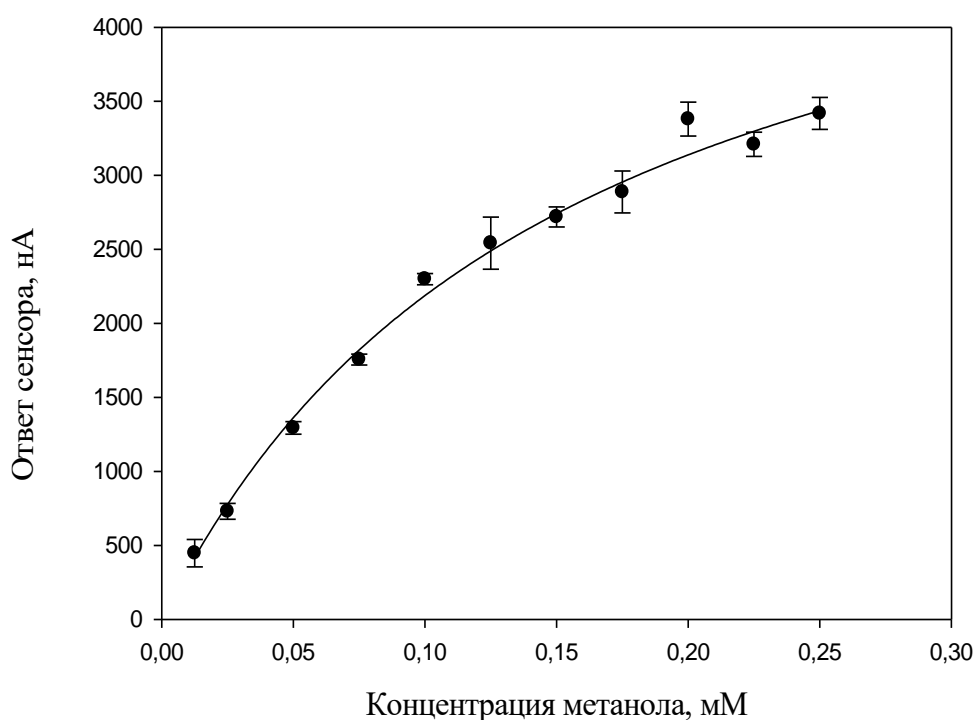


Рисунок 23. Градуировочная зависимость ответа сенсора на основе бесклеточного экстракта *M.extorquens* pCM160 от концентрации метанола

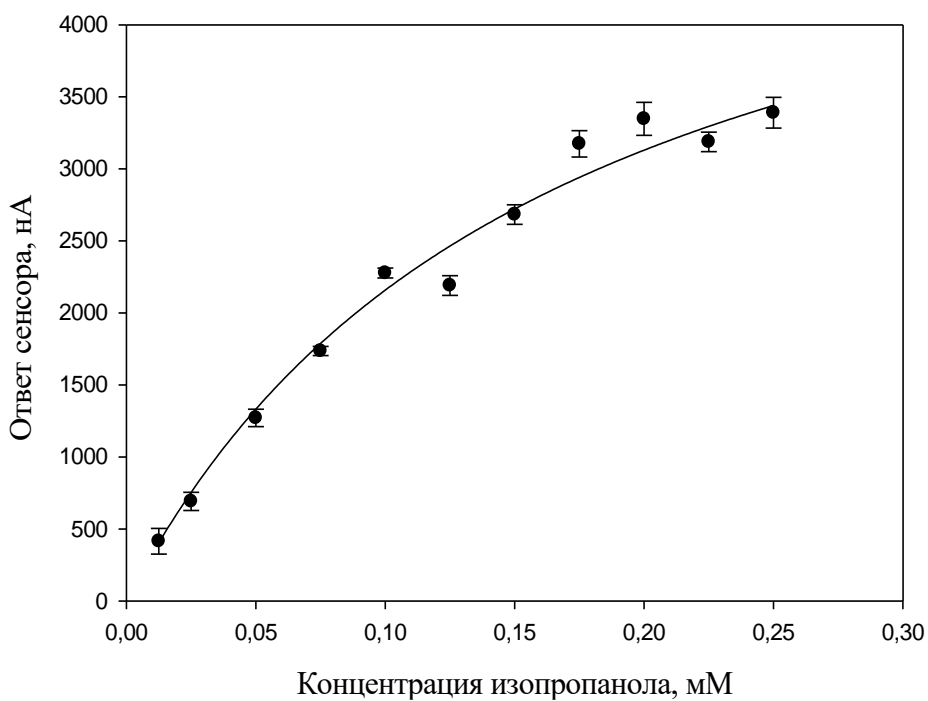


Рисунок 24. Градуировочная зависимость ответа сенсора на основе бесклеточного экстракта *M.extorquens* pCM160 от концентрации изопропанола

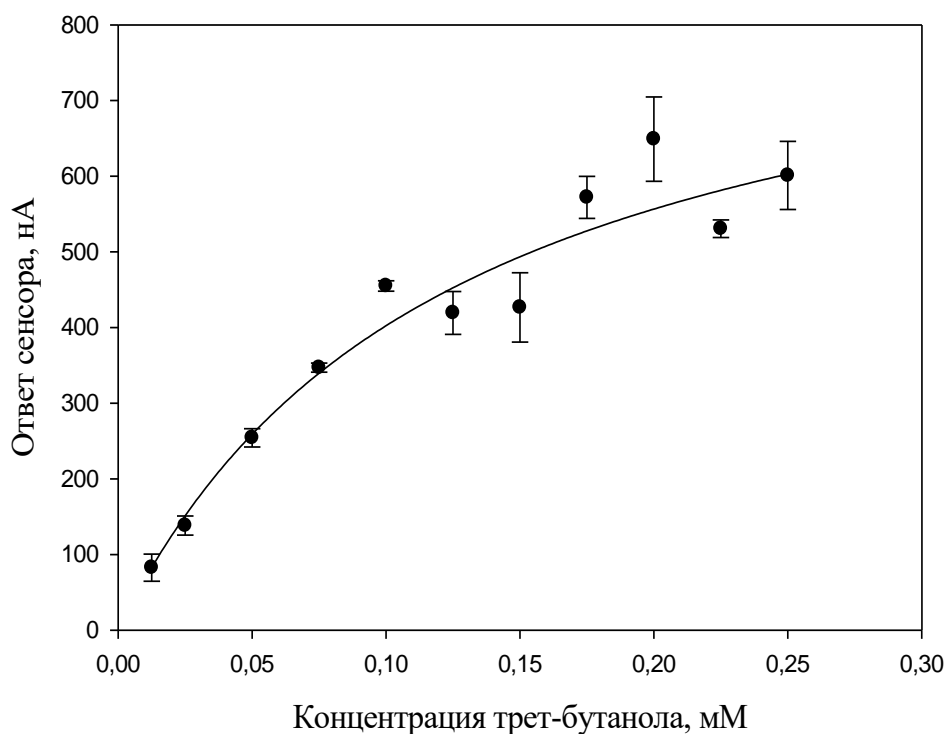


Рисунок 25. Градуировочная зависимость ответа сенсора на основе бесклеточного экстракта *M.extorquens* pCM160 от концентрации трет-бутанола

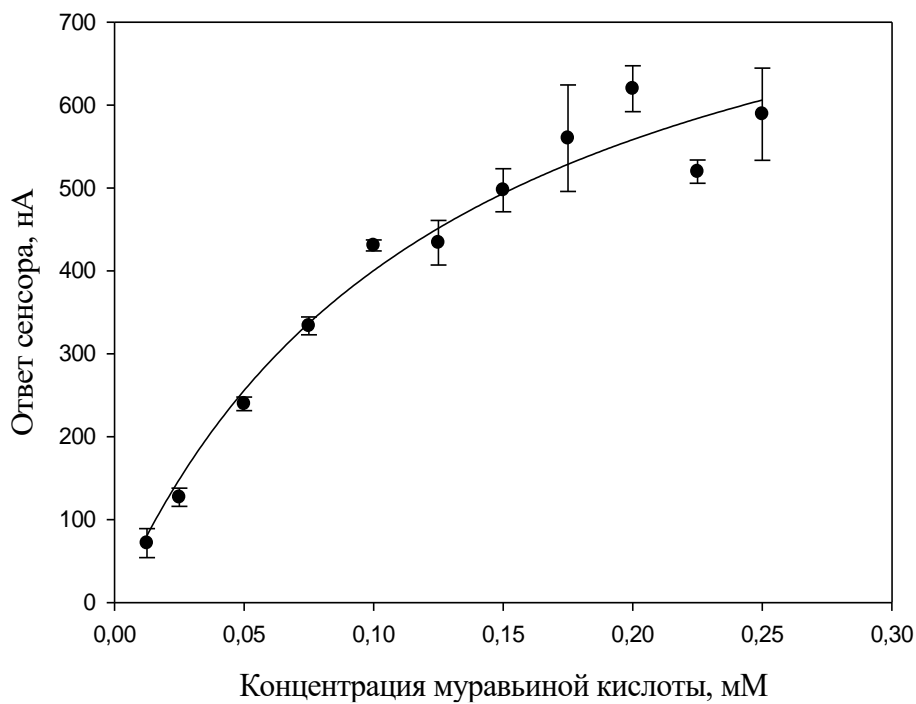


Рисунок 26. Градуировочная зависимость ответа сенсора на основе бесклеточного экстракта *M.extorquens* pCM160 от концентрации муравьиной кислоты

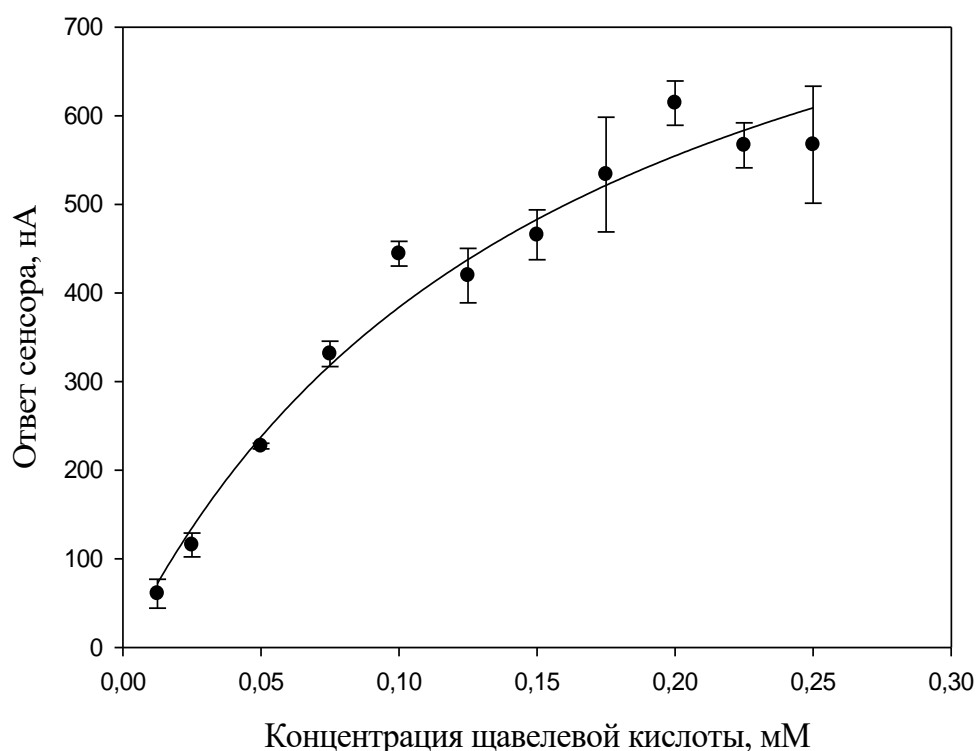


Рисунок 27. Градуировочная зависимость ответа сенсора на основе бесклеточного экстракта *M.extorquens* pCM160 от концентрации щавелевой кислоты

В табл. 19 приведены значения кинетических параметров уравнений калибровочных зависимостей по отношению к различным субстратам.

Таблица 19. Параметры уравнения Михаэлиса-Ментен для бесклеточного экстракта *M.extorquens* pCM160 по отношению к различным субстратам

Параметр	V_{\max} , нА	K_M , ммоль/л	R^2
Муравьиная кислота	920 ± 70	$0,12 \pm 0,02$	0,9491
Щавелевая кислота	1000 ± 80	$0,16 \pm 0,03$	0,9565
Метанол	5600 ± 300	$0,15 \pm 0,01$	0,9829
Трет-бутанол	900 ± 80	$0,13 \pm 0,03$	0,9068
Изопропанол	5700 ± 300	$0,16 \pm 0,02$	0,9853

По отношению к метанолу и изопропанолу максимальная скорость развития сигнала различается незначительно и составляет 5600 ± 300 нА и 5700 ± 300 нА соответственно. Также стоит отметить, что максимальная скорость для таких субстратов как муравьиная кислота и трет-бутанол ниже, но тоже практически совпадает и составляет 920 ± 70 нА и 900 ± 80 нА соответственно.

Что касается константы Михаэлиса, то наименьший данный параметр наблюдается у муравьиной кислоты ($0,12 \pm 0,02$ ммоль/л), также как и в спектрофотометрическом методе.

Для снижения ошибок анализа используют линейные участки калибровочных зависимостей (Рис. 28 - 32). Коэффициент чувствительности рассчитывался как тангенс угла наклона линейного участка калибровочной зависимости.

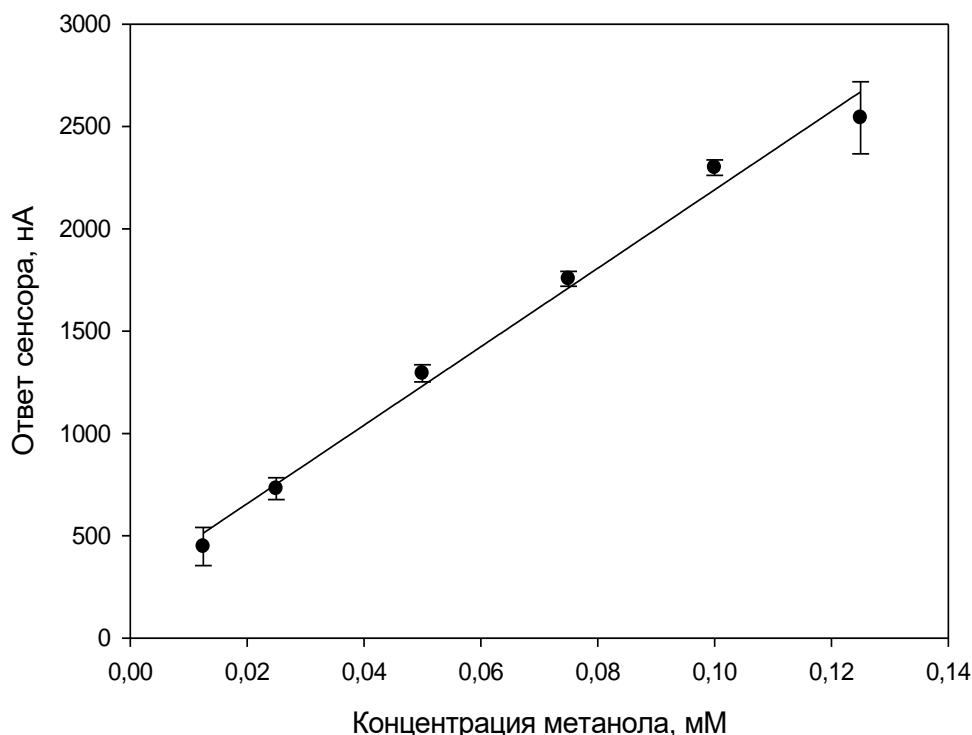


Рисунок 28. Линейный участок градуировочной зависимости ответа сенсора от концентрации метанола

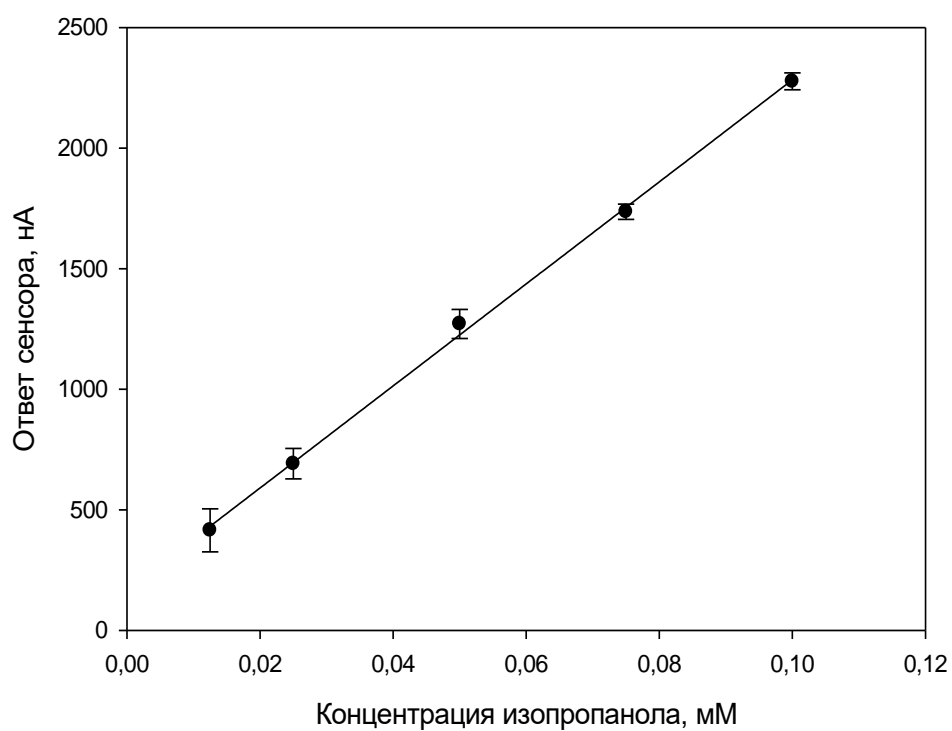


Рисунок 29. Линейный участок градуировочной зависимости ответа сенсора от концентрации изопропанола

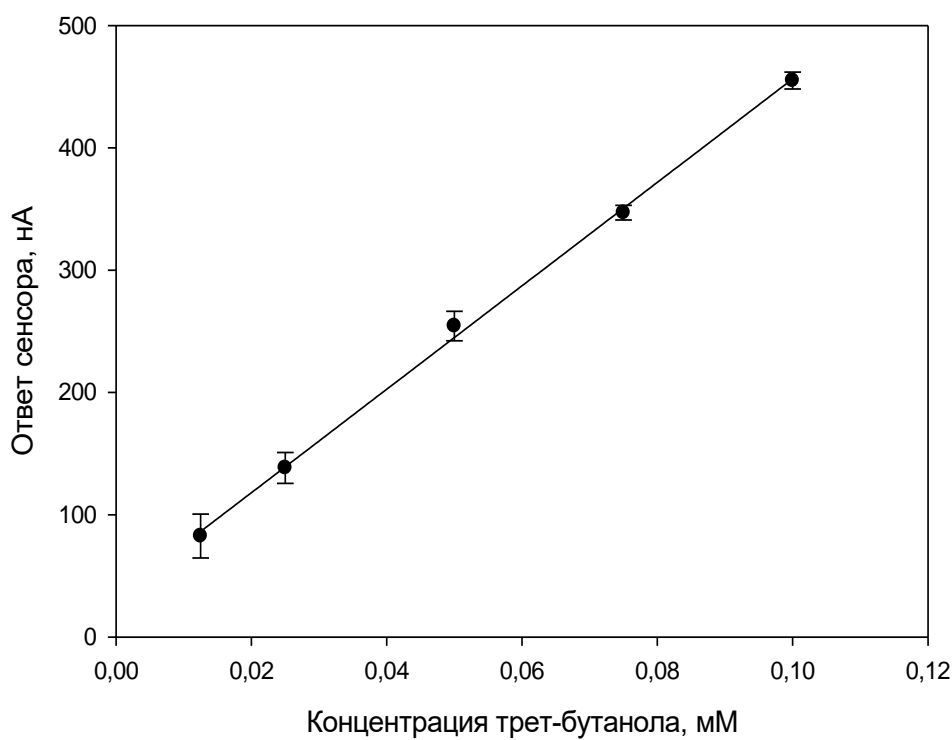


Рисунок 30. Линейный участок градуировочной зависимости ответа сенсора от концентрации трет-бутанола

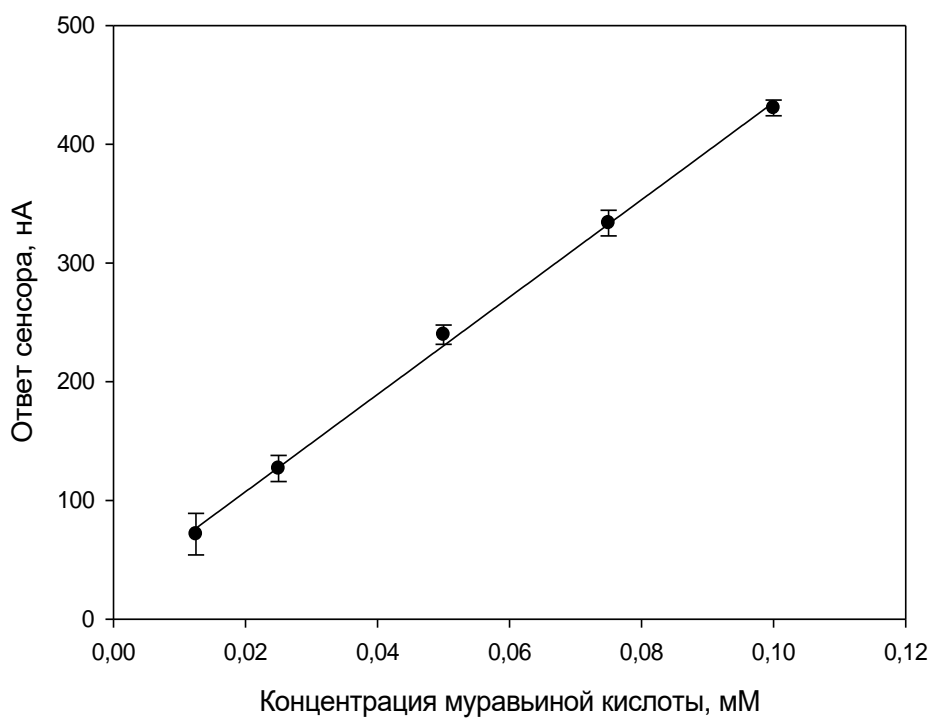


Рисунок 31. Линейный участок градуировочной зависимости ответа сенсора от концентрации муравьиной кислоты

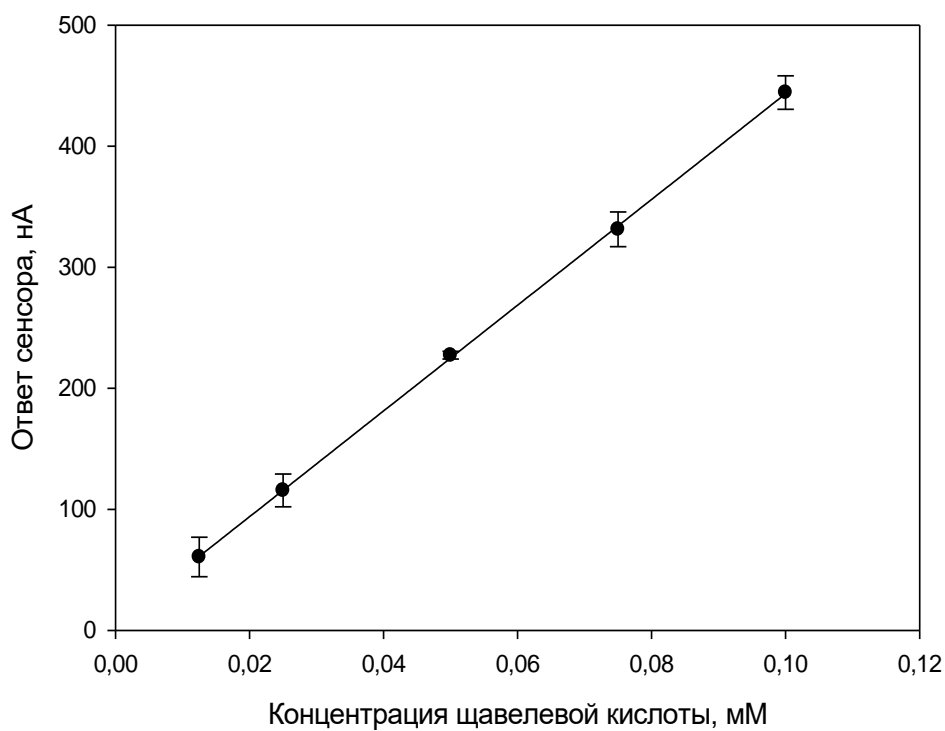


Рисунок 32. Линейный участок градуировочной зависимости ответа сенсора от концентрации щавелевой кислоты

Полученные участки аппроксимировали с помощью уравнения прямой, коэффициенты представлены в табл. 20.

Таблица 20. Параметры линейных зависимостей

Параметры	$a \pm \Delta a$	$b \pm \Delta b$	R^2
Муравьиная кислота	4090 \pm 90	25 \pm 6	0,9934
Щавелевая кислота	4370 \pm 90	7 \pm 6	0,9941
Метанол	19200 \pm 700	270 \pm 50	0,9804
Трет-бутанол	4230 \pm 90	33 \pm 6	0,9936
Изопропанол	21200 \pm 500	170 \pm 30	0,9937

Коэффициенты чувствительности (а) для метанола и изопропанола достаточно высоки (19200 \pm 700 и 21200 \pm 500 соответственно) по сравнению с другими субстратами, что свидетельствует о том, что возможно обнаружить и определить малые количества данных субстратов (метанола и изопропанола), получив один и тот же аналитический сигнал, и точнее определить одно и то же количество вещества.

3.7. Сравнительный анализ результатов, полученных спектрофотометрическим и электрохимическим методами

В ходе работы были выполнены исследования биокаталитических свойств бесклеточного экстракта рекомбинантных метиловых бактерий *M.extorquens* pCM160 двумя различными методами – спектрофотометрическим, основанным на изучении спектров поглощения в видимой (400-760 нм) области спектра, и амперометрическим, основанным на изучении зависимости тока, протекающего через электролитическую ячейку, от напряжения. Результаты показаны на рис.33 и в табл.21.

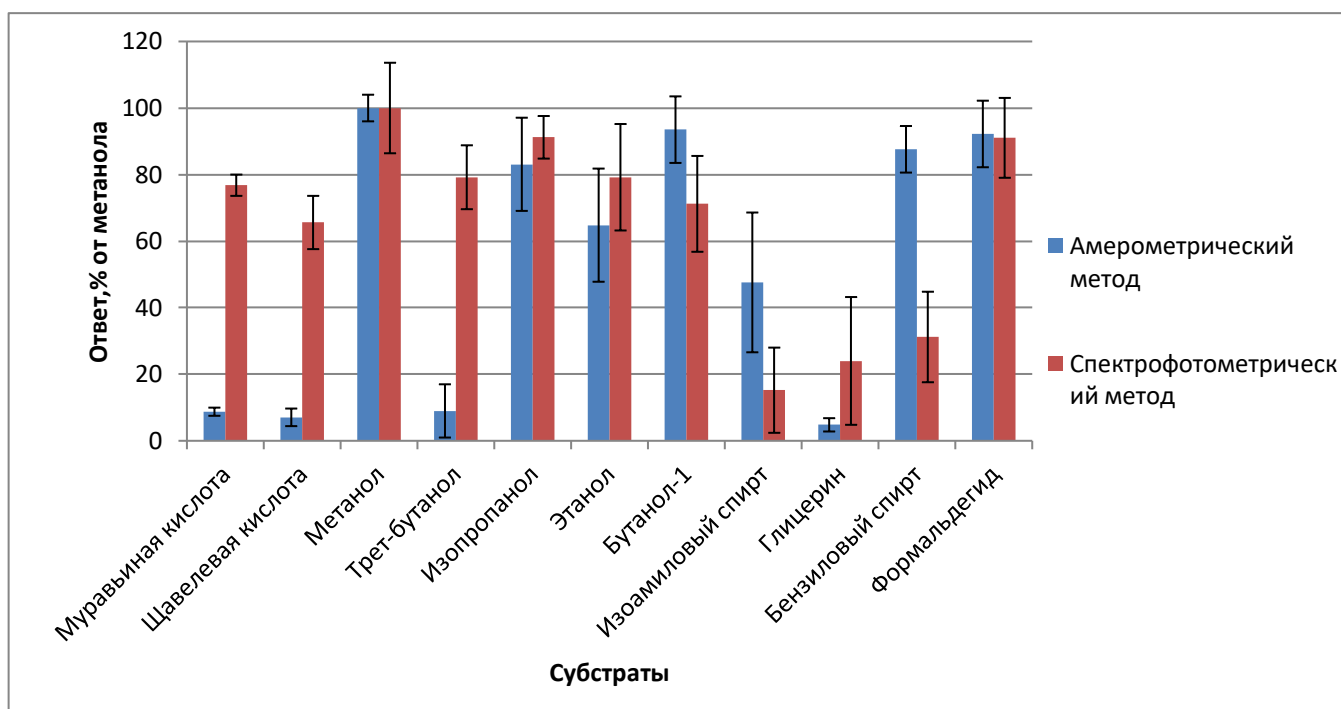


Рисунок 33. Субстратная специфичность бесклеточного экстракта

M. extorquens pCM160 двумя различными методами

Из диаграммы видно, что максимальная окислительная активность бесклеточного экстракта наблюдается к метанолу, что согласуется с литературными данными [23] и подтверждается высоким коэффициентом чувствительности на данный субстрат (Табл.20). Наименьшая активность в двух методах наблюдается к глицерину. Стоит отметить, что ответы на карбоновые кислоты в амперометрическом методе намного ниже, чем в спектрофотометрическом. Скорее всего, это связано с использованием разных медиаторов в методах. Вероятно, ферроцен не взаимодействует с формальдегиддегидрогеназой, содержащейся в бесклеточном экстракте, из-за чего мы наблюдаем низкий ответ. Таким образом, скорее всего использование различных медиаторов может влиять на специфичность бесклеточного экстракта и биокатализаторов в целом. Также стоит подчеркнуть, что амперометрический метод является более селективным. Однако чтобы убедиться в правильности предположения о возможном изменении специфичности в зависимости от медиатора требуются дополнительные исследования (использование ФМС и ДХФИФ в амперометрическом биосенсоре).

Таблица 21. Параметры уравнения Михаэлиса-Ментен для бесклеточного экстракта *M. extorquens* pCM160 по отношению к различным субстратам для двух методов анализа

Метод анализа	Субстраты	V_{max} , Ед/мг белка/нА	K_M , ммоль/л	R^2
Спектрофотометрический	Муравьиная кислота	0,093±0,002	0,2±0,1	0,9813
	Щавелевая кислота	0,065±0,003	1,0±0,4	0,9428
	Метанол	0,100±0,003	0,4±0,2	0,9455
	Трет-бутанол	0,090±0,004	0,7±0,3	0,9049
	Изопропанол	0,100±0,006	0,5±0,4	0,8983
Амперометрический	Муравьиная кислота	920±70	0,12±0,02	0,9491
	Щавелевая кислота	1000±80	0,16±0,03	0,9565
	Метанол	5600±300	0,15±0,01	0,9829
	Трет-бутанол	900±80	0,13±0,03	0,9068
	Изопропанол	5700±300	0,16±0,02	0,9853

Из приведенных данных видно, что в ходе спектрофотометрического анализа максимальная скорость процесса достигается при реакции бесклеточного экстракта с такими субстратами как метанол и изопропанол (0,100±0,003 Ед/мг белка и 0,100±0,006 Ед/мг белка соответственно). При амперометрическом анализе субстраты, максимальная скорость реакции с которыми равна 5600±300 нА и 5700±300 нА, совпадают с предыдущим методом (метанол и изопропанол соответственно).

Наименьшая константа Михаэлиса наблюдается у муравьиной кислоты сразу в двух методах исследования (в спектрофотометрическом методе - 0,2±0,1 ммоль/л; в амперометрическом - 0,12±0,02 ммоль/л). Коэффициент корреляции для всех субстратов при разных методах примерно совпадает.

Также стоит отметить, что в спектрофотометрическом анализе удельная активность на муравьиную кислоту ниже, чем на метанол, при этом константа Михаэлиса выше (Табл. 9, 18). Таким образом, можно сделать вывод, что муравьиная кислота окисляется не метанолдегидрогеназой, а другим ферментом – формиатдегидрогеназой, содержащейся в бесклеточном экстракте метиловых бактерий *M.extorquens* pCM160.

Таким образом, получив и проанализировав результаты исследования бесклеточного экстракта рекомбинантных метиловых бактерий *M.extorquens* pCM160 двумя химическими методами, можно сделать вывод, что фермент метанолдегидрогеназа, содержащийся в бесклеточном экстракте метилотрофных бактерий действующий, активный и способный катализировать окисление различных субстратов.

Выводы

1. Получен бесклеточный экстракт рекомбинантных метиловых бактерий *M.extorquens* pCM160 с помощью ультразвукового дезинтегрирования и центрифугирования, масса которого составила 5,6 г. Установлена концентрация белка – 11,042 мг/мл.

2. Определена максимальная удельная активность фермента МДГ в системе медиаторов ФМС+ДХФИФ (0,145 Ед/мг белка).

3. Изучен спектр окисляемых субстратов бесклеточного экстракта *M.extorquens* pCM160 - муравьиная кислота, щавелевая кислота, метанол, трет-бутанол, изопропанол, этанол, бутанол-1, изоамиловый спирт, глицерин, бензиловый спирт и формальдегид, спектрофотометрическим и амперометрическим методами.

Из субстратной специфичности, определенной спектрофотометрическим методом, видно, что максимальная каталитическая активность наблюдается к метанолу, что согласуется с литературными данными [23]. Такая же тенденция наблюдается и в амперометрическом методе. Также в амперометрическом методе можно заметить снижение каталитической активности фермента с увеличением длины углеводородной цепи субстрата.

4. Определены кинетические параметры фермента МДГ, содержащегося в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM160 по отношению к различным субстратам двумя методами – спектрофотометрическим и амперометрическим.

В первом методе (спектрофотометрическом) наименьшая константа Михаэлиса характерна для муравьиной кислоты ($0,2 \pm 0,1$ ммоль/л). В амперометрическом методе высокие коэффициенты чувствительности наблюдаются у метанола и изопропанола (19200 ± 700 и 21200 ± 500 соответственно).

5. Проведен сравнительный анализ результатов, полученных спектрофотометрическим и амперометрическим методами. В субстратной специфичности в обоих методах максимальная окислительная активность

бесклеточного экстракта наблюдается к метанолу, что подтверждается высоким коэффициентом чувствительности на данный субстрат.

Что касается кинетических параметров, исследуемых двумя методами, видно, что в ходе обоих методов максимальная скорость процесса достигается при реакции бесклеточного экстракта с такими субстратами как метанол и изопропанол (в спектрофотометрическом анализе - $0,100 \pm 0,003$ Ед/мг белка и $0,100 \pm 0,006$ Ед/мг белка соответственно; в амперометрическом - 5600 ± 300 нА и 5700 ± 300 нА)

Наименьшая константа Михаэлиса наблюдается у муравьиной кислоты сразу в двух методах исследования (в спектрофотометрическом методе - $0,2 \pm 0,1$ ммоль/л; в амперометрическом - $0,12 \pm 0,02$ ммоль/л).

6. Результаты, полученные спектрофотометрическим и амперометрическим методами, могут использоваться для дальнейших исследований в научно-практической деятельности. Фермент МДГ, содержащийся в бесклеточном экстракте рекомбинантных метилотрофных бактерий *M.extorquens* pCM160 активный, действующий и способный катализировать окисление различных субстратов.

Список литературы

1. Троценко Ю.А., Доронина Н.В., Торгонская М.Л. Аэробные метиловобактерии // Пуццино: ОНТИ ПНЦ РАН. 2010. 325 с.
2. Anthony C. The biochemistry of methylotrophs. / New York, NY: Academic Press – 1982.
3. Ю.А. Троценко. Аэробные метилотрофы – перспективные объекты современной биотехнологии // Журнал Сибирского федерального университета. Биология, 2012. Т. 5. № 3. С. 243-279.
4. Глазков В.В., Мизгунова У.М., Золотова Г.А., Долманова И.Ф. Ферментативное определение этанола и метанола // Журн. аналит. химии. 1997.–Т. 52, № 1.–С. 83.
5. Ю.А. Троценко. Биология аэробных метиловобактерий – деструкторов галометанов / Ю.А. Троценко и Н.В. Доронина // Микробиология, 2003. Т. 72. № 2. С. 149-160.
6. M.E. Lidstrom. Aerobic methylotrophic prokaryotes. New York: Springer-Verlag, 2006. Chapter 1.20.P. 618-634.
7. Определитель бактерий Берджи. Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Кринга, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса.–М.: Мир.–1997.–Т. 1–432 с.
8. Leisinger, T., Braus-Stromeyer S.A. Bacterial growth with chlorinated methanes // Environ. Health Perspect.1995.–V. 103.–P. 33 – 36.
9. S.Vuilleumier. Methylobacterium Genome Sequences: A Reference Blueprint to Investigate Microbial Metabolism of C₁ Compounds from Natural and Industrial Sources // Plos one, 2009. V. 4, № 5. P. 16.
10. D.O. Mountfort. Oxidation of Aromatic Alcohols by Purified Methanol Dehydrogenase from *Methylosinustrichosporium* // J.Bacteriology, 1990.V. 172, № 7.P. 3690–3694.
11. X. Zhang, S. Y. Reddy, T. C. Bruice. Mechanism of methanol oxidation by quinoprotein methanol dehydrogenase // PNAS, 2007.V. 104, № 3.P. 745–749.

12. L.Qinfeng, J.R. Kirchhoff. A rapid method for the purification of methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* // Protein Expression and Purification, 2006.V. 46. P. 316–320.

13. Т.А.Кузнецова, Ю.А. Троценко. Конструирование рекомбинантной плазмиды для экспрессии гена метанолдегидрогеназы. Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов: Всероссийский симпозиум с международным участием. Москва, МГУ им. М.В. Ломоносова. Биологический факультет. 24-27 декабря 2014 г.: Материалы. М.: Макс Пресс, 2014. С. 137.

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

15. Alejandro G. Marangoni Enzyme kinetics: a modern approach / Department of Food Science University of Guelph – 2003.

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

17. K. Habermüller. Electron-transfer mechanisms in amperometric biosensors / K. Habermüller, M. Mosbach, W. Schuhmann // J. Anal. Chem.,2000. V. 366. P. 560-568.

18. T. Ikeda. An Electrochemical Approach to the Studies of Biological Redox Reactions and Their Applications to Biosensors, Bioreactors, and Biofuel Cells / T. Ikeda and K. Kano // J. Biosci Bioeng, 2001. V. 92,№1. P. 9-18.

19. Э.Тернер, И. Карубе, Дж. Уилсон. Биосенсоры: основы и приложения. М.: Мир, 1992. С. 578.

20. В.А. Алферов. Эффективность медиаторов электронного транспорта при электрокаталитическом окислении субстратов иммобилизованными бактериями / В.А. Алферов, Е.Е. Бабкина, О.Н. Понаморева, И.В. Россинская, Е.В. Чубарова, И.В. Блохин, А.Н. Решетилов // Известия ТулГУ. Сер. Химия, 2004. Т. 4. С. 104-112.

21. Е.Ю. Чигринова. Микробные сенсоры на основе производных ферроцена и бензохинона, применяемых в качестве медиаторов / Е.Ю. Чигринова, Е.Е. Бабкина,

О.Н. Понаморева, В.А. Алферов, А.Н. Решетилов // Сенсорные системы, 2007. Т. 21. С. 263-269.

22. Д.А. Леменовский. Сандвичевые металлокомплексные соединения. Ферроцен. // Соросовский образовательный журнал, 1997. №2. С. 66-69.

23. М. Грин. Металлоорганические соединения переходных металлов. М.: Мир, 1972. С. 456.

24. О.Н. Понаморева, В.А. Арляпов, А.Н. Решетилов, В.А. Алферов. Биосенсоры и биотопливные элементы. Тула: Изд-во ТулГУ, 2010. С. 255.

25. Г.А. Евтюгин, Г.К. Будников, Е.Е. Стойкова. Основы биосенсорики. Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина, 2007. С.80.

26. J.M. Dicks, W.J. Aston, G. Davis, A.P.F. Turner. Mediated amperometric biosensors for D-galactose, glycolate and L-amino acids based on a ferrocene-modified carbon paste electrode, 1986. V. 218. P. 103-112.

27. Плеханова Ю.В., Фирсова Ю.Е., Доронина Н.В., Троценко Ю.А., Решетилов А.Н. Аэробные метиловобактерии как основа биосенсора для детекции дихлорметана // Прикл. Биохим. Микробиол. -2013. – Т. 49 (№2). – С.203

28. Кузнецова Т.А., Понаморева О.Н., Решетников А.С., Горячева А.А. Биоэлектрокаталитическое окисление формальдегида метиловобактериями *Methylobacterium dichloromethanicum* ДМ4 в присутствии медиатора электронного транспорта - ферроцена. // ИзвестияТулГУ. Естественныенауки. Тула: Изд-воТулГУ.-Вып. 1. -2012. – С.236-245.

29. Кузнецова Т.А., Понаморева О.Н., Алферов В.А. Эффективность биоэлектрокаталитического окисления метанола клетками метилотрофных бактерий в присутствии медиаторов электронного транспорта // Известия ТулГУ. Естественные науки. Тула: Изд-во ТулГУ.- Вып. 1. -2013. – С.222-232.

30. Кузнецова Т.А., Бесчастный А. П., Алфёров С.В., Троценко Ю.А. Свойства модифицированных амперометрических биосенсоров на основе

метанолдегидрогеназы и клеток *Methylobacterium nodulans* // Прикл. Биохим. Микробиол. -2013. – Т. 49 (№6). - С.613-618.

31. G. Wen, X. Wen, S. Shuang, M.M.F. Choi, Whole-cell biosensor for determination of methanol // Sensors and Actuators B: Chemical 2014. –V. 201, № 1. –Р. 586–591.

32. Глазков В.В., Мизгунова У.М., Золотова Г.А., Долманова И.Ф. Ферментативное определение этанола и метанола // Журн. аналит. химии. 1997.–Т. 52, № 1.–С. 83.

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. Mary Lidstrom, Methods in Enzymology, Hydrocarbons and Methylo trophy, Volume 188, 1st Edition – 1990.

35. Невмержицкая Ю.Ю., Тимофеева О.А. Практикум по физиологии и биохимии растений (белки и ферменты): Учебно-методическое пособие/Казань: Казанский университет – 2012.

36. Арляпов В.А. Амперометрический биосенсор для определения глюкозы на основе глюкозооксидазы, иммобилизованной в электропроводящий гель // Известия ТулГУ. Естественные науки. - Вып.1. - Тула, 2016.

37. Кузнецова Т.А., Бесчастный А.П., Понаморева О.Н., Троценко Ю.А. Очистка и характеристика метанолдегидрогеназы ризосферного фитосимбионта *Methylobacterium nodulans* // Прикл. Биохим. Микробиол. -2012. – Т. 48 (№6). - С.1-6.

38. Досон Р., Эллиот Д. Справочник биохимика: Пер. с англ./Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонсон К. – М.: Мир, 1991.

Приложение

Таблица 6. Анализируемые субстраты

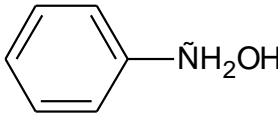
Субстрат	Структурная формула
Муравьиная кислота	HCOOH
Щавелевая кислота	HOOC—COOH
Метанол	$\text{CH}_3\text{—OH}$
Трет-бутанол	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{HO—C—CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Изопропанол	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array}$
Этанол	$\text{CH}_3\text{—CH}_2\text{—OH}$
Бутанол-1	$\text{CH}_3\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—OH}$
Изоамиловый спирт	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{HO—}\tilde{\text{N}}\text{H}_2\text{—}\tilde{\text{N}}\text{H}_2\text{—}\tilde{\text{N}}\text{H—CH}_3 \end{array}$
Глицерин	$\begin{array}{c} \text{HO—}\tilde{\text{N}}\text{H}_2\text{—}\tilde{\text{N}}\text{H—}\tilde{\text{N}}\text{H}_2\text{—OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$
Бензиловый спирт	
Формальдегид	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{H} \quad \text{O} \end{array}$

Таблица 7. Экспериментальные данные спектрофотометрического анализа субстратной специфичности бесклеточного экстракта *M.extorquens* pCM160

Субстрат	Удельная активность, Ед/мг белка	Доверительный интервал, Ед/мг белка
Муравьиная кислота	0,096	0,004
Щавелевая кислота	0,08	0,01
Метанол	0,13	0,02
Трет-бутанол	0,09	0,01
Изопропанол	0,114	0,008
Этанол	0,08	0,02
Бутанол-1	0,08	0,02
Изоамиловый спирт	0,02	0,02
Глицерин	0,03	0,02
Бензиловый спирт	0,04	0,02
Формальдегид	0,11	0,02

Таблица 8. Экспериментальные данные спектрофотометрического анализа бесклеточного экстракта *M. extorquens* pCM160 на основе субстрата муравьиной кислоты

Концентрация НСООН, 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	0,481	1	0,05	2
0,015	0,003	0,519	1	0,05	2
0,025	0,003	0,490	1	0,05	2
0,025	0,003	0,489	1	0,05	2
0,010	0,003	0,455	1	0,05	2
0,010	0,003	0,483	1	0,05	2
0,0075	0,003	0,448	1	0,05	2
0,0075	0,003	0,480	1	0,05	2
0,0050	0,003	0,460	1	0,05	2
0,0050	0,003	0,469	1	0,05	2
0,0025	0,003	0,448	1	0,05	2
0,0025	0,003	0,462	1	0,05	2
0	0,003	0,058	1	0,05	2

Таблица 9. Расчетные данные активности МДГ бесклеточного экстракта *M.extorquens* pCM160 на основе субстрата муравьиной кислоты

Концентрация НСООН, моль/л	Активность, Ед/мл	Исходная концентрация белка мг/мл	Удельная активность, Ед/мг белка
0,015	1,006	11,042	0,091
0,015	1,086	11,042	0,098
0,025	1,025	11,042	0,093
0,025	1,023	11,042	0,093
0,010	0,952	11,042	0,086
0,010	1,011	11,042	0,092
0,0075	0,937	11,042	0,085
0,0075	1,004	11,042	0,091
0,0050	0,962	11,042	0,087
0,0050	0,981	11,042	0,089
0,0025	0,937	11,042	0,085
0,0025	0,966	11,042	0,088
0	0,116	11,042	0,010

Таблица 10. Экспериментальные данные спектрофотометрического анализа бесклеточного экстракта *M.extorquens* pCM160 на основе субстрата щавелевой кислоты

Концентрация НООС— СООН, 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	0,351	1	0,05	2
0,015	0,003	0,330	1	0,05	2
0,025	0,003	0,344	1	0,05	2
0,025	0,003	0,328	1	0,05	2
0,010	0,003	0,316	1	0,05	2
0,010	0,003	0,278	1	0,05	2
0,0075	0,003	0,277	1	0,05	2
0,0075	0,003	0,273	1	0,05	2
0,0050	0,003	0,268	1	0,05	2
0,0050	0,003	0,272	1	0,05	2
0,0025	0,003	0,255	1	0,05	2
0,0025	0,003	0,263	1	0,05	2
0	0,003	0,048	1	0,05	2

Таблица 11. Расчетные данные активности МДГ бесклеточного экстракта *M.extorquens* pCM160 на основе субстрата щавелевой кислоты

Концентрация НООС—СООН, моль/л	Активность, Ед/мл	Исходная концентрация белка мг/мл	Удельная активность, Ед/мг белка
0,015	0,733	11,042	0,066
0,015	0,688	11,042	0,062
0,025	0,718	11,042	0,065
0,025	0,684	11,042	0,062
0,010	0,659	11,042	0,060
0,010	0,579	11,042	0,052
0,0075	0,577	11,042	0,052
0,0075	0,568	11,042	0,051
0,0050	0,558	11,042	0,051
0,0050	0,566	11,042	0,051
0,0025	0,531	11,042	0,048
0,0025	0,547	11,042	0,050
0	0,095	11,042	0,087

Таблица 12. Экспериментальные данные спектрофотометрического анализа бесклеточного экстракта *M. extorquens* pCM160 на основе субстрата метанола

Концентрация CH ₃ OH, 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	0,650	1	0,05	2
0,015	0,003	0,625	1	0,05	2
0,015	0,003	0,588	1	0,05	2
0,025	0,003	0,628	1	0,05	2
0,025	0,003	0,607	1	0,05	2
0,025	0,003	0,579	1	0,05	2
0,010	0,003	0,625	1	0,05	2
0,010	0,003	0,605	1	0,05	2
0,010	0,003	0,581	1	0,05	2
0,0075	0,003	0,616	1	0,05	2
0,0075	0,003	0,600	1	0,05	2
0,0075	0,003	0,568	1	0,05	2
0,0050	0,003	0,617	1	0,05	2
0,0050	0,003	0,520	1	0,05	2
0,0050	0,003	0,585	1	0,05	2
0,0025	0,003	0,580	1	0,05	2
0,0025	0,003	0,492	1	0,05	2
0	0,003	0,055	1	0,05	2

Таблица 13. Расчетные данные активности МДГ бесклеточного экстракта *M. extorquens* pCM160 на основе субстрата метанола

Концентрация CH ₃ OH, моль/л	Активность, Ед/мл	Исходная концентрация белка мг/мл	Удельная активность, Ед/мг белка
0,015	1,362	11,042	0,123
0,015	1,309	11,042	0,119
0,015	1,232	11,042	0,112
0,025	1,316	11,042	0,119
0,025	1,272	11,042	0,115
0,025	1,213	11,042	0,110
0,010	1,309	11,042	0,119
0,010	1,267	11,042	0,115
0,010	1,217	11,042	0,110
0,0075	1,291	11,042	0,117
0,0075	1,257	11,042	0,114
0,0075	1,189	11,042	0,108
0,0050	1,293	11,042	0,117
0,0050	1,088	11,042	0,099
0,0050	1,225	11,042	0,111
0,0025	1,215	11,042	0,110
0,0025	1,029	11,042	0,093
0	0,109	11,042	0,010

Таблица 14. Экспериментальные данные спектрофотометрического анализа бесклеточного экстракта *M. extorquens* рСМ160 на основе субстрата трет-бутанола

Концентрация трет-бутанола, 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	0,488	1	0,05	2
0,015	0,003	0,501	1	0,05	2
0,015	0,003	0,466	1	0,05	2
0,025	0,003	0,459	1	0,05	2
0,025	0,003	0,463	1	0,05	2
0,025	0,003	0,439	1	0,05	2
0,010	0,003	0,43	1	0,05	2
0,010	0,003	0,435	1	0,05	2
0,010	0,003	0,442	1	0,05	2
0,0075	0,003	0,415	1	0,05	2
0,0075	0,003	0,408	1	0,05	2
0,0075	0,003	0,374	1	0,05	2
0,0050	0,003	0,110	1	0,05	2
0,0050	0,003	0,488	1	0,05	2
0,0050	0,003	0,501	1	0,05	2
0,0025	0,003	0,466	1	0,05	2
0,0025	0,003	0,459	1	0,05	2
0	0,003	0,463	1	0,05	2

Таблица 15. Расчетные данные активности МДГ бесклеточного экстракта *M. extorquens* pCM160 на основе субстрата трет-бутанола

Концентрация трет-бутанола, моль/л	Активность, Ед/мл	Исходная концентрация белка мг/мл	Удельная активность, Ед/мг белка
0,015	1,021	11,042	0,092
0,015	1,048	11,042	0,095
0,015	0,975	11,042	0,088
0,025	0,960	11,042	0,087
0,025	0,968	11,042	0,088
0,025	0,918	11,042	0,083
0,010	0,899	11,042	0,081
0,010	0,909	11,042	0,082
0,010	0,924	11,042	0,084
0,0075	0,867	11,042	0,079
0,0075	0,853	11,042	0,077
0,0075	0,781	11,042	0,071
0,0050	0,225	11,042	0,020
0,0050	1,021	11,042	0,092
0,0050	1,048	11,042	0,095
0,0025	0,975	11,042	0,088
0,0025	0,960	11,042	0,087
0	0,968	11,042	0,088

Таблица 16. Экспериментальные данные спектрофотометрического анализа бесклеточного экстракта *M.extorquens* pCM160 на основе субстрата изопропанола

Концентрация изопропанола, 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	0,540	1	0,05	2
0,015	0,003	0,589	1	0,05	2
0,015	0,003	0,585	1	0,05	2
0,025	0,003	0,532	1	0,05	2
0,025	0,003	0,536	1	0,05	2
0,025	0,003	0,472	1	0,05	2
0,010	0,003	0,538	1	0,05	2
0,010	0,003	0,459	1	0,05	2
0,010	0,003	0,540	1	0,05	2
0,0075	0,003	0,451	1	0,05	2
0,0075	0,003	0,528	1	0,05	2
0,0075	0,003	0,429	1	0,05	2
0,0050	0,003	0,113	1	0,05	2
0,0050	0,003	0,540	1	0,05	2
0,0050	0,003	0,589	1	0,05	2
0,0025	0,003	0,585	1	0,05	2
0,0025	0,003	0,532	1	0,05	2
0	0,003	0,536	1	0,05	2

Таблица 17. Расчетные данные активности МДГ бесклеточного экстракта *M.extorquens* pCM160 на основе субстрата изопропанола

Концентрация изопропанола, моль/л	Активность, Ед/мл	Исходная концентрация белка мг/мл	Удельная активность, Ед/мг белка
0,015	1,131	11,042	0,102
0,015	1,234	11,042	0,112
0,015	1,225	11,042	0,111
0,025	1,114	11,042	0,101
0,025	1,122	11,042	0,102
0,025	0,987	11,042	0,089
0,010	1,126	11,042	0,102
0,010	0,960	11,042	0,087
0,010	1,131	11,042	0,102
0,0075	0,943	11,042	0,085
0,0075	1,105	11,042	0,100
0,0075	0,897	11,042	0,081
0,0050	0,232	11,042	0,021
0,0050	1,131	11,042	0,102
0,0050	1,234	11,042	0,112
0,0025	1,225	11,042	0,111
0,0025	1,114	11,042	0,101
0	1,122	11,042	0,102

AntiPlagiarism.NET

Файл Правка Вид Операции Дополнительно Справка Etxt.ru - биржа контента

Стандартная Экспресс Глубокая На реерйт

Пакетная проверка Проверка сайта SEO проверка Проверка картинок

Проверить уникальность Игнорировать домены:

Редактор Адрес: http:// Страница

Текст(67845):

Химия
(наименование)
Метанолдегидрогеназа из бесклеточного экстракта метиловобактерий
M.extorquens
pSM160 как биокатализатор амперометрического медиаторного биосенсора(тема
)Студент группы 420461 Улитина М.А. (подпись, дата) (фамилия, инициалы)Руководитель работы
к.х.н., доц. Кузнецова Т.А. (подпись, дата) (фамилия, инициалы)Заведующий кафедрой
к.х.н., проф. Алферов В.В. (подпись, дата) (фамилия, инициалы)Тула, 2020Содержание

Введение
41. Литературный обзор
6 1.1. Аэробные метилотрофные бактерии 6 1.1.1. Род Methylobacterium 6 1.1.2. Характеристика PQQ - зависимой дегидрогеназы

Журнал: Автопрокрутка

[22:32:01] Возникла ошибка при чтении файла: https://www.novotechnik.com/pdfs/LWX_e_Serie_001_2010_02.pdf (Недоступно чтение

[22:32:23] Возникла ошибка при чтении файла: <http://repo.ssau.ru/bitstream/Methodicheskie-ukazaniya/Ch-2-Spravochnye-dannye-k-raschet>

[22:32:31] Возникла ошибка при чтении файла: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293743/4293743178.pdf> (Недоступно чтение через IFilter

[22:33:30] Возникла ошибка при чтении файла: http://vgnt.ru/gallery/docs/doc_11.pdf (Недоступно чтение через IFilter)

[22:33:34] Тип проверки: *Стандартная* (Размер выборки = 10, Число выборок = 20, Число ссылок на выборку = 5, Поисквики = Gc

[22:33:34] Настройки: Число слов в шингле = 8, Игнорировать цитаты = Да, Порог уникальности = 70%

[22:33:34] **Уникальность текста 98%** © (Проигнорировано подстановок: 0%) (Проигнорировано цитат: 0%)