

КОШКАРОВА
ЛИЛИЯ АНДРЕЕВНА

**Разработка метода количественной оценки водорода с помощью биосенсора на
основе гидрогеназы *Thiocapsa roseopersicina* BBS**

03.02.03 - микробиология
03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена на кафедре микробиологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Научный руководитель: Нетрусов Александр Иванович
доктор биологических наук, профессор.

Официальные оппоненты: Стадничук Игорь Николаевич
доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, ведущий научный сотрудник.

Намсараев Зоригто Баирович
кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт", ведущий научный сотрудник.

Ведущая организация:
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук», г. Пущино.

Защита состоится 6 декабря 2016 г. в 15.30 на заседании диссертационного совета Д.501.001.21 при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, дом 1, МГУ, корп.12, Биологический факультет, ауд. М-1.

Тел.: 8(495)939-54-83, эл. почта: npiskunkova@rambler.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МГУ и на сайте биологического факультета МГУ <http://www.bio.msu.ru/>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2016 года

Ученый секретарь
диссертационного совета

Пискункова Нина Федоровна.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В настоящее время все более широкое распространение получают сенсоры, в качестве распознающего элемента которых выступает биологический объект. Их действие основано на важнейших химических реакциях живых организмов: антитело/антиген, фермент/субстрат, рецептор/гормон. Поскольку данные реакции высокоспецифичны, указанные сенсоры крайне чувствительны и селективны. Чаще всего в качестве чувствительных элементов сенсоров используют ферменты. Для таких сенсоров могут быть использованы преобразователи различных типов (Evtugyn, 2014), но в большей части выпускаемых в промышленности биосенсоров в настоящее время используют электрохимические преобразователи, что обусловлено их невысокой стоимостью, простотой изготовления и использования (Эггинс, 2005).

Возможность применения фермента в качестве чувствительного элемента биосенсора определяют его доступность (простота и дешевизна выделения и очистки), стабильность при хранении и иммобилизации, наличие удобных для аппаратурного оформления способов регистрации сигнала, достигаемые аналитические характеристики определения субстрата либо эффектора. Поэтому для создания сенсора необходима комплексная работа по оптимизации всех указанных этапов.

В качестве чувствительного элемента для детекции водорода может быть использован фермент гидрогеназа, который *in vivo* отвечает за образование/поглощение водорода клетками. Хотя гидрогеназы катализируют довольно простую реакцию, однако она используется в различных метаболических путях у широкого спектра микроорганизмов (Vignais, Billoud, 2007). В последние десятилетия все больше возрастает интерес к гидрогеназам, наблюдается значительный прогресс в изучении данной группы ферментов. Понимание строения, функционирования и их роли в клетке помимо фундаментального значения имеет и практическую значимость. Поскольку данные ферменты принимают активное участие в процессе анаэробной коррозии, то их изучение будет способствовать борьбе с этим процессом. Также открываются все новые возможности практического применения гидрогеназ, в числе которых можно выделить следующие: образование водорода в фотокаталитических системах, получение энергии в топливных элементах за счет использования гидрогеназных электродов, очистка сточных вод, зараженных тяжелыми металлами, регенерации кофакторов, биосинтез химических веществ, меченных дейтерием или тритием (Гоготов и др., 2010).

HynSL гидрогеназа пурпурной серной бактерии *Thiocapsa roseopersicina* BBS в последние годы привлекает к себе внимание биотехнологов в связи со своей стабильностью. Данный фермент с широким температурным диапазоном вплоть до 80°C

(Gogotov et al., 1978) способен к катализу в присутствии O_2 (Morozov et al., 2006), в сравнении с платиной более устойчив к действию таких каталитических ядов, как сероводород и угарный газ (Зорин и др., 1986), хорошо иммобилизуется. Исходя из вышеуказанных характеристик, данный фермент перспективен для использования в качестве чувствительного элемента биосенсора.

Таким образом, в качестве чувствительного элемента в сенсорах на водород может выступать фермент. Современные технологии изготовления электрохимических сенсоров, в частности трафаретная печать, дают возможность миниатюризировать сенсорные структуры, а также менять форму и материал основы, варьируя их в зависимости от потребностей заказчика.

Цель работы состояла в создании научных основ технологии получения электрохимических биосенсоров на основе гидрогеназы из *Thiocapsa roseopersicina* BBS.

Задачи:

1. Разработать и оптимизировать условия культивирования штамма-продуцента *Thiocapsa roseopersicina* BBS.
2. Подобрать методы и условия для длительного хранения *T. roseopersicina* BBS.
3. Оценить выживаемость *T. roseopersicina* BBS в лиофилизированной форме с применением кинетического аппарата (тест на ускоренное хранение).
4. Выделить чистый препарат HynSL гидрогеназы из *T. roseopersicina* BBS для дальнейшего использования в качестве сенсорного элемента на водород.
5. Создать с использованием выделенного фермента комбинированную сенсорную систему.
6. Исследовать возможность прямого анализа H_2 в среде культивирования с применением разработанного электрохимического биосенсора.

Научная новизна. Оптимизированная схема лиофильного высушивания позволила получить сублимированный препарат с высокой выживаемостью пурпурной серной бактерии *Thiocapsa roseopersicina* BBS, при том, что лиофилизация считается непригодной для хранения данной группы микроорганизмов. Показано соответствие кинетической модели выживаемости микроорганизмов экспериментальным данным, что позволило прогнозировать сроки хранения лиофилизированной культуры. Предложена модифицированная схема очистки гидрогеназы *T. roseopersicina* BBS, исключающая использование на последней стадии препаративного электрофореза, что дает возможность масштабировать выделение фермента с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) с использованием показанных носителей. Показана

принципиальная возможность использования гидрогеназного электрода на основе HynSL гидрогеназы *T. roseopersicina* BBS в качестве сенсора на водород. Разработана технология измерения H₂ в двух режимах - потенциометрическом и амперометрическом. Установлено отсутствие влияния двуокиси углерода и метана на работу сенсора. Разработаны технологические операции для анализа водорода непосредственно в среде культивирования микроорганизмов.

Практическая значимость работы. Разработанные технологические операции культивирования *Thiocapsa roseopersicina* BBS и выделения гидрогеназы из данного микроорганизма позволяют снизить стоимость получения фермента. Оптимизированная методика лиофильного высушивания может быть использована для длительного хранения родственных групп микроорганизмов, поскольку является более экономичной в сравнении с рекомендуемой для пурпурных серных бактерий криоконсервацией. Разработанные научные основы технологии производства водородных биосенсоров в дальнейшем могут быть использованы для производства сенсоров, используемых в различных сферах деятельности человека, таких как медицина (детекция концентрации водорода в выдыхаемом воздухе, как показатель состояния желудочно-кишечного тракта), биотехнология (детекция образования биоводорода, контроль состояния сообщества метантенков), научные исследования, промышленная безопасность (контроль дозрывоопасных концентраций водорода в рабочих помещениях) и т.п.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на VIII всероссийской научной молодежной школе с международным участием «Возобновляемые источники энергии» (Москва, 2012), на Международном форуме Reenfor-2013 «Возобновляемая энергетика. Пути повышения энергетической и экономической эффективности» (Москва, 2013), на XXVII зимней молодежной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2015), на XXII и XXIII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2015, 2016), на 7-й международной конференции «Photosynthesis Research for Sustainability» (Пушино, 2016).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 136 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения полученных данных, заключения, выводов, приложения. Список литературы включает 254 источник, 216 из которых англоязычные. Работа иллюстрирована 43 рисунками и 6 таблицами.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 работ, в том числе 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность к.б.н. Зорину Н.А. (ИФПБ РАН), к.б.н. Динариевой Т.Ю. (МГУ им. М.В. Ломоносова) за совместную работу по выделению и очистке белка, благодарит Jörg Kahnt (Max Planck Institute for Terrestrial Microbiology, Marburg, FRG) за содействие в проведении МАЛДИ масс-спектрометрии. Автор искренне благодарит сотрудников лаборатории электрохимических методов кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, в особенности к.х.н. Воронина О.Г. за помощь и ценные рекомендации.

Особую благодарность автор выражает научному руководителю д.б.н. Нетрусову А.Н., искренне благодарит сотрудников лаборатории к.б.н. Митрофанову Т.А., к.б.н. Абрамова С.М., к.б.н. Садрадинову Э.Р. и Шестакова А.И. за переданные знания, опыт практической работы и всестороннюю поддержку.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы. В работе использовали штамм серной пурпурной бактерии *Thiocapsa roseopersicina* BBS, полученный из коллекции фототрофных микроорганизмов кафедры микробиологии МГУ (№13 КМ МГУ). Штамм №21 термофильного сахаролитического, образующего H₂ микроорганизма был выделен из целлюлозолитического водород-образующего сообщества, полученного из образца коровьего навоза.

Культивирование микроорганизмов. Получение биомассы. Культивирование *T. roseopersicina* BBS проводили на свету при 28°C на модифицированной среде Пфенинга. После культивирования в течение 4-7 суток, в зависимости от объема и конфигурации емкостей культивирования, биомассу отделяли сепарированием. Сырую биомассу хранили в морозильном ларе при температуре -80°C. Культивирование штамма №21 проводили в темноте при 60°C на модифицированной среде Имшенецкого. Состав сред приведен в полном тексте кандидатской диссертации. В случае строго анаэробного культивирования во флаконах заменяли газовую фазу на аргон.

Методы длительного хранения *T. roseopersicina*. Лиофилизация. В качестве защитной среды использовали 10% сухое обезжиренное молоко (СОМ) с 7,5% сахарозой. Лиофильное высушивание проводили с помощью прибора FreeZone¹ (Labconco, США) при глубине вакуума в 0,043 мбар, температуре конденсора -52°C в течение 1,5 - 2 суток, в зависимости от объема проб. По окончании высушивания газовую фазу в вакуумной камере восстанавливали осушенным инертным газом во избежание попадания влажного воздуха в ампулы, затем ампулы запаивали под вакуумом газовой-кислородной горелкой.

Тест на ускоренное хранение. Запаянные ампулы помещали на хранение при температурах 25, 35 и 50°C. Через определенные промежутки времени ампулы вскрывали и делали высеив на полужидкий агар для проверки жизнеспособности клеток. Для каждой температуры после подсчета количества жизнеспособных клеток рассчитывали константу скорости физико-химических процессов, протекающих в образце и приводящих к снижению выживаемости клеток. На основе данных коэффициентов по уравнению Аррениуса и правилу Вант-Гоффа (метод Q_{10}) рассчитывали предполагаемую константу для хранения при 4°C (Кузнецов и др., 1977; King et al., 1998; Donev, 2001).

Хранение при низких температурах (-80°C). Для хранения использовали культуру в конце логарифмической - начале стационарной фазы роста. Клетки отделяли центрифугированием, после чего ресуспендировали в свежей питательной среде. В качестве криопротектора использовали диметилсульфоксид (ДМСО) в конечной концентрации 5%, часть образцов замораживали без криопротектора.

Выделение и очистка гидрогеназы. В первом случае схема очистки включала получение ацетонового порошка, обработку суспендированного порошка ультразвуком, фракционирование сульфатом аммония, удаление термолabile белков прогреванием до 70°C, гидрофобную хроматографию на фенилсефарозе, анионообменную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе DE52, повторную хроматографию на фенилсефарозе CL-4B, препаративный электрофорез в 7,5% ПААГ. В модифицированной схеме очистки на первом этапе получали фракцию мембран. Хроматографию проводили с помощью системы FPLC (Pharmacia, Швеция) - гидрофобную (фенилсефароза CL-6B), ионообменную (Q-сефароза FF) и хроматофокусирование (Mono P).

Измерение гидрогеназной активности. Активность фермента определяли по восстановлению метилвиологена водородом спектрофотометрическим методом в анаэробной кювете (Zorin et al., 1996). Для расчета активности использовали молярный коэффициент восстановленного метилвиологена – $\epsilon_{600}=1,3 \cdot 10^4 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ (Thorneley, 1974).

Приготовление ферментных электродов. Электрополимеризацию нейтрального красного проводили на поверхности графитовой ткани из фосфатного буферного раствора при pH 6. Сорбцию гидрогеназ проводили в течение 12 часов из раствора, содержащего 1 мг/мл фермента при температуре 4°C (0,5 М KCl, 20 мМ K-фосфатный буфер, pH 7).

Электрохимические измерения. Электрохимические исследования ферментных электродов проводились в трехэлектродной ячейке с разделенным пространством всех электродов, в следующих условиях: 0,05М K_2HPO_4 , 0,1М KCl, pH 7, 25°C, если иное не указано особо. Конструкция ячейки предусматривала продувку газом поверх и через раствор. Электродом сравнения служил хлорсеребряный электрод, в качестве

вспомогательного использовали стеклоуглеродный электрод. Поляризационные кривые записывали с помощью потенциостата EmStat 2 PalmSens (Нидерланды). Смеси газов готовили и подавали с помощью формирователя газовых потоков "Хроматэк-Кристалл ФГП" (Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Культивирование

Для оптимизации условий и повышения экономичности культивирования *T. roseopersicina* BBS были внесены некоторые изменения в состав среды. Для данного штамма показан оптимум солености 1-2% (Турова и др., 2009). Исходя из этого, концентрацию вносимого NaCl уменьшили с 20 до 10 г/л. Оставшиеся 4 соли минерального фона - KH_2PO_4 , NH_4Cl , KCl , MgCl_2 – вносили в концентрации 0,33 г/л, в соответствии с модификацией В.М. Горленко (Богоров, 1974). Также из среды исключили хлорид кальция и снизили концентрацию сульфида натрия с 1 до 0,6 г/л. Внесенные изменения в состав среды не оказали влияния на рост культуры и накопления биомассы.

Долговременное хранение *T. roseopersicina* BBS

Для долговременного хранения штамма-продуцента выбрали две формы – хранение в замороженном состоянии при низких температурах (-80°C) и в лиофилизированном виде. Температура замораживания имеет большое значение при хранении культуры. Практически все известные группы бактерий способны длительно храниться при криогенных температурах (менее -153°C), которые обеспечивают сжиженные газы. Но этот способ довольно затратный, при этом показано, что температуры -70°C достаточно для длительного хранения большого количества видов микроорганизмов (Heckly, 1978). Было показано, что такой внутриклеточный криопротектор как ДМСО повышает выживаемость исследуемой культуры после замораживания, но и при отсутствии криопротектора после замораживания титр падает меньше чем на порядок и сохраняется в пределах этого порядка в течение полугода хранения (Таблица 1). Также было показано, что скорость замораживания не оказывает значимого влияния на выживаемость клеток.

Таблица 1. Оценка жизнеспособности клеток культуры *T. roseopersicina* BBS после замораживания и хранения при -80 °С.

	Исходный титр	Концентрация жизнеспособных клеток на мл суспензии при хранении при -80 °С		
		Сутки	2 месяца	6 месяцев
Без криопротектора	$(5,2 \pm 0,1) \times 10^{10}$	$(6,7 \pm 2) \times 10^9$	$(5,6 \pm 1,7) \times 10^9$	$(1,4 \pm 0,5) \times 10^9$
ДМСО (5%)	$(3,3 \pm 0,2) \times 10^{10}$ *	$(3,4 \pm 0,3) \times 10^{10}$	$(1,3 \pm 0,25) \times 10^{10}$	$(1,1 \pm 0,6) \times 10^{10}$

* - после инкубирования с ДМСО в течение 20 минут.

Лиофилизация широко используется и оптимальные условия подобраны для большого количества культур, тем не менее, для сохранения пурпурных серных бактерий метод не рекомендуется, поскольку считается, что эта группа микроорганизмов не переносит процесс сублимации (The Prokaryotes..., 2006; Bergey's..., 2009). В литературе сведений по лиофилизации фототрофов крайне мало, но имеющиеся данные свидетельствуют о том, что лиофильное высушивание применимо как долгосрочный способ хранения для данной группы микроорганизмов (Malik 1990; Kupletskaya, Netrusov, 2011). Для лиофилизации *T. roseopersicina* BBS в качестве защитной среды использовали 10% сухое обезжиренное молоко с 7,5% сахарозой, все этапы подготовки культуры проводили в аэробных условиях, поскольку данный штамм не является строгим анаэробом. Исходное количество жизнеспособных клеток составило $(11 \pm 0,2) \times 10^8$ на миллилитр суспензии, после замены среды культивирования защитной средой концентрация клеток снизилась до $(7,5 \pm 2) \times 10^8$ кл/мл. После лиофилизации концентрация жизнеспособных клеток составила $(2 \pm 0,5) \times 10^8$ кл/мл. При этом в работе (Malik, 1990) после лиофильного высушивания типового штамма того же вида титр *Thiocapsa roseopersicina* DSM 217 упал на 1,5 порядка, а методика была значительно сложнее использованной в данной работе. Можно предположить, что выбранная нами защитная среда и условия лиофилизации лучше подходят для хранения данной культуры. Так же, возможно, что более высокая выживаемость культуры в нашем эксперименте обусловлена свойствами штамма BBS, так как разные штаммы одного вида могут по-разному переносить лиофильное высушивание (Prakash et al., 2013).

Таким образом, полученные нами данные наряду с работами (Malik 1990; Kupletskaya, Netrusov, 2011) подтверждают тот факт, что пурпурные серные бактерии могут быть сохранены лиофильным высушиванием.

Сохранение высокого титра культуры непосредственно после процесса лиофилизации не всегда коррелирует с длительным сроком хранения (Heskly, 1961; Кузнецов и др., 1977). Тест на ускоренное хранение является удобным способом «экспресс-оценки» сроков хранения культуры, он позволяет на основе данных о хранении при высоких температурах определить примерные сроки хранения при температуре, интересующей исследователя. На основании данных о выживаемости культуры через различные сроки хранения при 50, 35 и 25°C построили графики (представлены в полном тексте работы) зависимости концентрации жизнеспособных клеток от температуры и рассчитали константу скорости реакции для каждой температуры ($k_{25^{\circ}\text{C}}=0,045$, $k_{35^{\circ}\text{C}}=0,208$, $k_{50^{\circ}\text{C}}=1,333$). Зависимость k от температуры описывали при помощи уравнения Аррениуса (график представлен в полном тексте работы) либо, более упрощенно, по правилу Вант-Гоффа (иначе метод Q_{10}). На основании теста на ускоренное хранение можно заключить, что концентрация жизнеспособных клеток (при использовании в качестве защитной среды 10% СОМ с 7,5% сахарозой, при исходном титре 2×10^8 при температуре хранения 4°C) через десять лет хранения составит не ниже $7,2 \times 10^3$ клеток на мл (Таблица 2).

Таблица 2. Прогнозируемые показатели количества жизнеспособных клеток *Thiocapsa roseopersicina* при хранении ампул при 4°C (КОЕ/мл).

Метод прогнозирования	Значение k для 4°C (1/сутки)	1 год	5 лет	10 лет
По уравнению Аррениуса	0,00176	$1,0 \times 10^8$	$8,0 \times 10^6$	$3,2 \times 10^5$
По правилу Вант-Гоффа $k_{50^{\circ}\text{C}} \rightarrow k_{4^{\circ}\text{C}}$	0,00226	$8,8 \times 10^7$	$3,2 \times 10^6$	$5,2 \times 10^4$
По правилу Вант-Гоффа $k_{35^{\circ}\text{C}} \rightarrow k_{4^{\circ}\text{C}}$	0,00279	$7,2 \times 10^7$	$1,2 \times 10^6$	$7,2 \times 10^3$
По правилу Вант-Гоффа $k_{25^{\circ}\text{C}} \rightarrow k_{4^{\circ}\text{C}}$	0,00244	$8,2 \times 10^7$	$2,4 \times 10^6$	$2,8 \times 10^4$

Выделение и очистка гидрогеназы из *T. roseopersicina* BBS

Мембраносвязанная HynSL-гидрогеназа *T. roseopersicina* BBS привлекает к себе внимание исследователей в связи со своей стабильностью. Она сохраняет активность после удаления из мембраны, является относительно устойчивой к инактивирующему действию кислорода, сульфида и угарного газа, температурный оптимум находится около 80°C. HynSL-гидрогеназа является перспективным ферментом для использования в

биологических топливных элементах, создания сенсоров на водород на основе ферментного электрода. Поэтому оптимизация и удешевление систем выделения и очистки гидрогеназы является необходимым этапом дальнейшего применения данного фермента в биотехнологии.

Клетки *T. roseopersicina* BBS разрушали ацетоном (100%), основные этапы очистки представлены в таблице 3. В результате был получен электрофоретически гомогенный препарат с удельной активностью 38 мкмоль H_2 /мин на мг белка.

Таблица 3. Очистка гидрогеназы HynSL из *T. roseopersicina* BBS.

Стадия очистки	Белок общий, мг	Общая активность, мкмоль H_2 /мин	Удельная активность, мкмоль H_2 /мин · мг белка	Степень очистки	Выход, %
Суспендированный ацетоновый порошок	66350	3509	0.052	1	100
Обработка ультразвуком	23875	2050	0,086	1,65	58,4
Фракционирование $(NH_4)_2SO_4$ (30-70%)	10155	530	0,053	1,02	15,1
Нагревание, 70°C	2711	469	0,17	3,3	13,4
Фенилсефароза CL-4B	593	410	0,69	13	11,7
ДЭАЭ–целлюлоза DE52	231	393	1,7	32,5	11,2
Фенилсефароза CL-4B	44,2	329	7,44	135	9,4
Электрофорез	8,6	301	35	636	8,5
ДЭАЭ–целлюлоза DE52	5,76	219	38	690	6,2

В дальнейшей работе внесли ряд изменений в схему очистки, общая схема представлена в таблице 4. Поскольку гидрогеназа связана с клеточной мембраной, на первом этапе работы получили фракцию мембран. Таким образом на первом этапе избавлялись от большого количества цитоплазматических белков, поэтому такие методы как прогревание и фракционирование сульфатом аммония в данном случае были не столь эффективны.

Таблица 4. Очистка гидрогеназы HynSL из *T. roseopersicina* BBS.

Стадия очистки	Белок общий, мг	Общая активность, мкмоль Н ₂ /мин	Удельная активность, мкмоль Н ₂ /мин · мг белка.	Степень очистки	Выход, %
Фракция мембран	336,5	147,9	0,4	1	100,0
Экстракт	76,7	53,4	0,7	1,8	36,1
Фракционирование (NH ₄) ₂ SO ₄ (30-70%)	61,8	74,0	1,2	3,0	50,0
Нагревание, 70°C	52,7	65,4	1,2	3,0	44,2
Фенилсефароза CL 6B	39,8	58,8	1,5	3,8	39,8
Q-Сефароза FF	1,3	9,6	7,3	18,3	6,5
Моно P	0,18	7,8	43,3	108,3	5,3

Считается, что гидрогеназа связана с цитохромом, на который передает электроны *in vivo*, он блокирует туннелирование электрона от дистального железо-серного кластера на электрод, а эффективно разделить фермент и цитохром возможно только на стадии электрофореза (Воронин, 2010). Так, было показано, что при использовании для изготовления электродов препаратов фермента, не прошедших эту стадию очистки, максимальная активность электродов была в 3 раза ниже (Воронин, 2010). В нашей работе мы модифицировали систему очистки белка и не использовали препаративный электрофорез. При этом мы получили функционирующий гидрогеназный электрод с активностью, сопоставимой с активностью электродов, полученных на основе метода очистки гидрогеназы, включающего электрофорез. Таким образом, в дальнейшей работе возможно масштабирование процесса очистки за счет использования препаративных установок ВЭЖХ с использованием носителей того же типа, что использовались в данной работе.

Идентификацию полученного белка проводили при помощи метода МАЛДИ (матрично-ассоциированная лазерная десорбция/ионизация) масс-спектрометрии. На основании анализа полученного спектра с помощью программы Mascot, было показано, что в образце содержится гомогенный препарат HynSL гидрогеназы *T. roseopersicina* BBS, степень соответствия полученного фермента с предшественником большой субъединицы

(*hynL*) стабильной NiFe-содержащей гидрогеназы *T. roseopersicina* BBS составила 60%, а с предшественником малой субъединицы (*hynS*) – 37%.

Оценка электрохимических характеристик ферментного электрода на основе гидрогеназы *T.roseopersicina* BBS

Биоэлектродокатализ гидрогеназами в присутствии промотора – нейтрального красного

Ранее было показано (Karyakin et al., 2007), что эффективность биоэлектродокатализа можно увеличить за счет нанесения на поверхность электрода положительно заряженного полимера, в структуре которого присутствуют заместители, являющиеся переносчиками электронов с/на гидрогеназу. При выборе полимера важную роль играет его цена и коммерческая доступность. Для данной работы был выбран азиновый краситель нейтральный красный. Он, как и ряд азинов, способен полимеризоваться на поверхности электрода с образованием положительно заряженных слоев (Karyakin, 1999), а область его электроактивности близка к равновесному водородному потенциалу. Значения плотности тока на электроде с модифицированной поверхностью в 4-5 выше при всех значениях потенциалов. Максимальное значение тока окисления водорода при модификации электрода нейтральным красным составляет 850 мкА/см², что ниже значений, полученных для электродов модифицированных поливиологеном и полиполипиррол-виологеном, для которых значения составляют 1200 и 1400 мкА/см² соответственно (Morozov et al, 2006), но при этом нейтральный красный является недорогим, коммерчески доступным реактивом с низкой токсичностью, что оправдывает его использование.

Использование нейтрального красного для дизайна поверхности электрода позволяет получать высокоактивные водородные ферментные электродокатализаторы окисления водорода. Максимальный ток окисления водорода составляет 850 мкА/см² при потенциале 200 мВ.

Исследование зависимости электрохимических характеристик ферментных электродов от концентрации водорода

Целью дальнейшей работы была оценка принципиальной возможности применения ферментного электрода для оценки концентрации водорода в среде. Были протестированы два режима работы - потенциометрический и амперометрический, поскольку возможны расхождения по чувствительности и линейных диапазонам.

В первом случае измеряли зависимость потенциала открытой цепи от концентрации водорода (рис. 1). Из уравнения Нернста следует, что потенциал

пропорционален логарифму концентрации водорода. Поэтому строили зависимость потенциала от логарифма концентрации водорода (рис. 2). Зависимость линеаризовали в диапазоне от 0 до 30% (рис. 1), при этом коэффициент детерминации составил 0,979. Но при диапазоне от 0 до 100% он составляет 0,949.

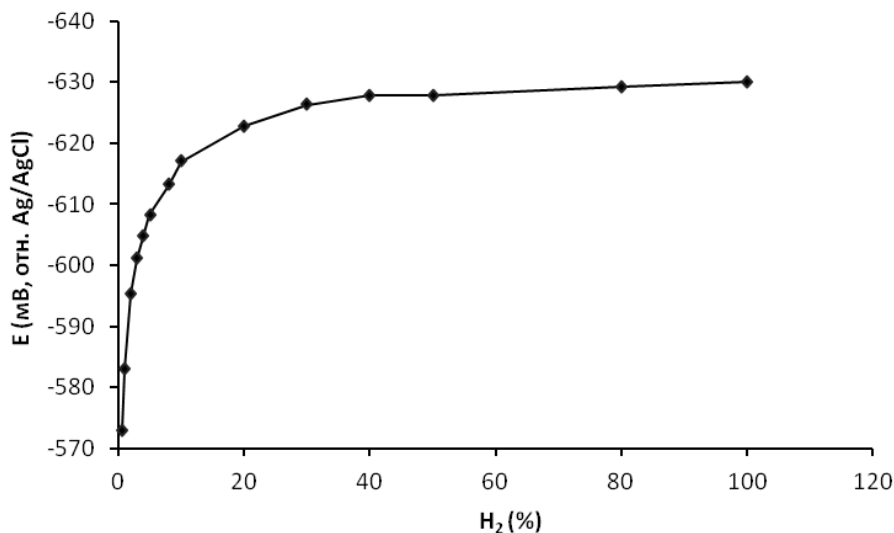


Рис. 1. Зависимость потенциала разомкнутой цепи от концентрации водорода для гидрогеназного электрода (0,05 М КН₂РО₄, 0,1 М КСl, 25°С, рН 7).

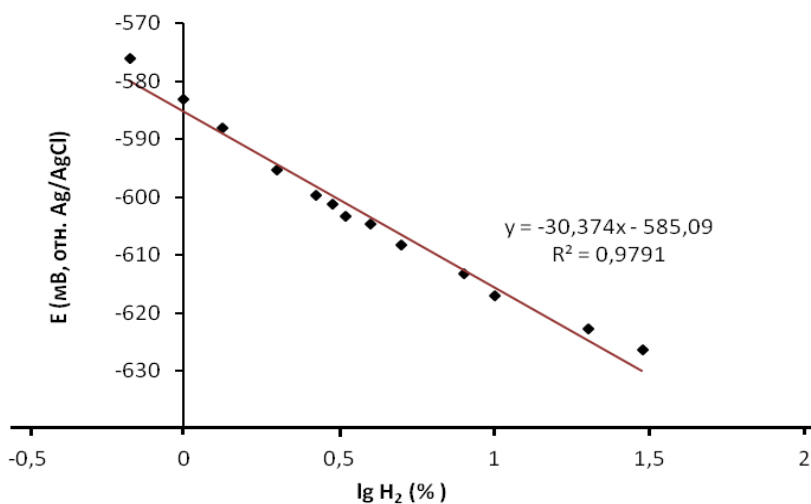


Рис. 2. Зависимость потенциала разомкнутой цепи от логарифма концентрации водорода для гидрогеназного электрода (0,05 М КН₂РО₄, 0,1 М КСl, рН 7, 25°С).

Протестировали также амперометрический режим работы. На рисунке 3 представлен график зависимости плотности тока от концентрации водорода. При линеаризации данных в билогарифмической системе координат в диапазоне от 0 до 30% водорода коэффициент детерминации равен 0,962 (рис. 4), при этом от 0 до 100% коэффициент равен 0,9.

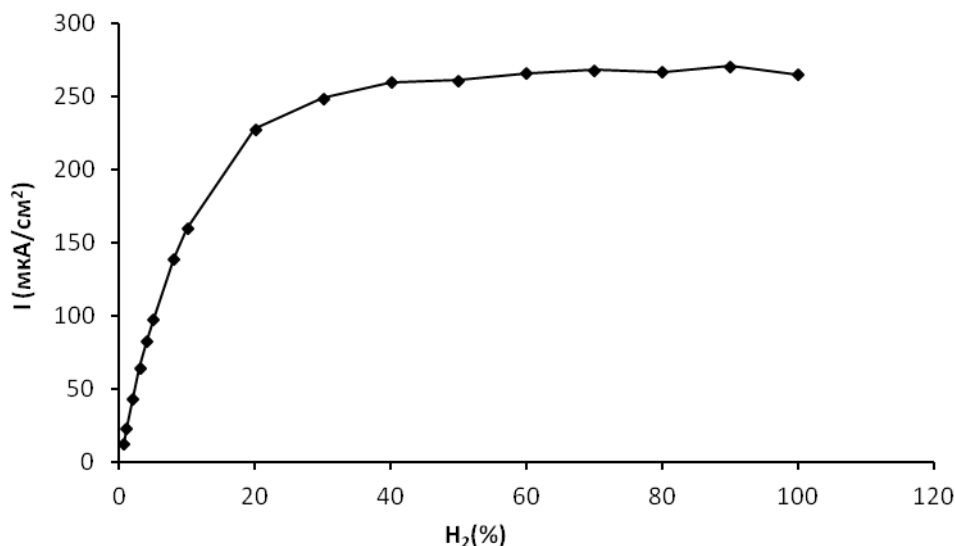


Рис. 3. Зависимость плотности тока от концентрации водорода для гидрогеназного электрода при потенциале 100 мВ относительно потенциала разомкнутой цепи (0,05 М КН₂РО₄, 0,1 М КСl, рН 7, 25°С).

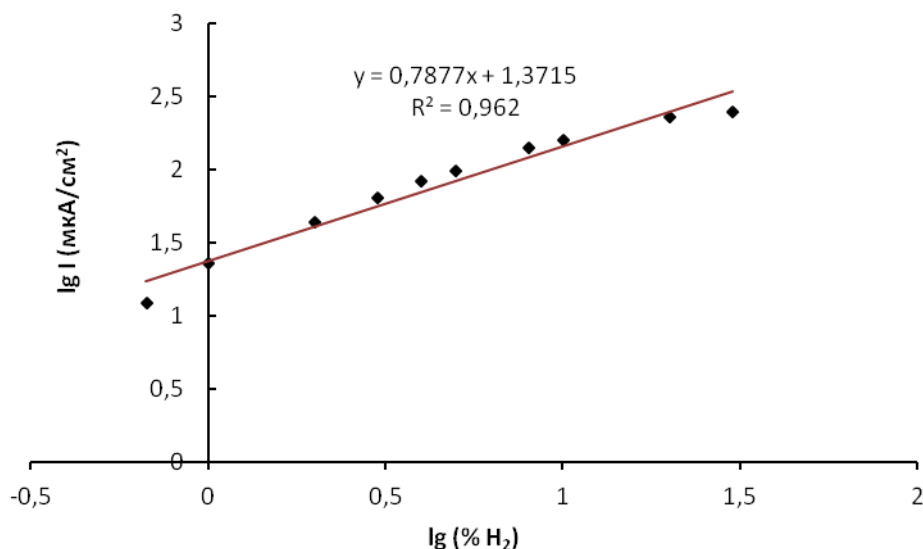


Рис. 4. Зависимость логарифма плотности тока от логарифма концентрации водорода для гидрогеназного электрода при потенциале 100мВ относительно потенциала разомкнутой цепи (0,05 М КН₂РО₄, 0,1 М КСl, рН 7, 25°С).

Таким образом, была показана возможность функционирования электрода в качестве сенсора как в потенциометрическом, так и амперометрическом режиме.

Принимая силу тока как скорость химической реакции, рассчитали кажущуюся константу Михаэлиса. $K_m(\text{каж})=0,09 \text{ мМ H}_2$.

Предлагаемая нами схема измерений, в которой строение электрода подразумевает непосредственную передачу электронов на электрод, имеет преимущество над

представленными в литературе аналогами (Qian et al., 2002; Lutz, Fan, 2005). Фермент в такой системе находится в иммобилизованной форме, не требуется внесение медиаторов в раствор. В сравнении с аналогами предложенный нами электрод имеет более простое устройство, его возможно миниатюризировать, в частности, используя технологию трафаретной печати (screen-printed электроды). Это дешевый и простой в исполнении метод обеспечивает простоту массового производства, высокую воспроизводимость получаемого продукта и низкую стоимость, что дает возможность одноразового применения (Couto et al., 2016).

Влияние метана и двуокиси углерода на электрохимическую активность гидрогеназных электродов

Поскольку ферментный электрод предполагается помещать непосредственно в среду культивирования микроорганизмов, необходимо исследовать влияние образуемых микроорганизмами метаболитов на его работу. Одними из основных продуктов анаэробного микробного сообщества могут быть метан и углекислый газ. Для подтверждения предположения о том, что метан и двуокись углерода не влияют на работу гидрогеназного электрода, проверили возможность данных газов вызывать анодные токи и снижать значения токов окисления водорода.

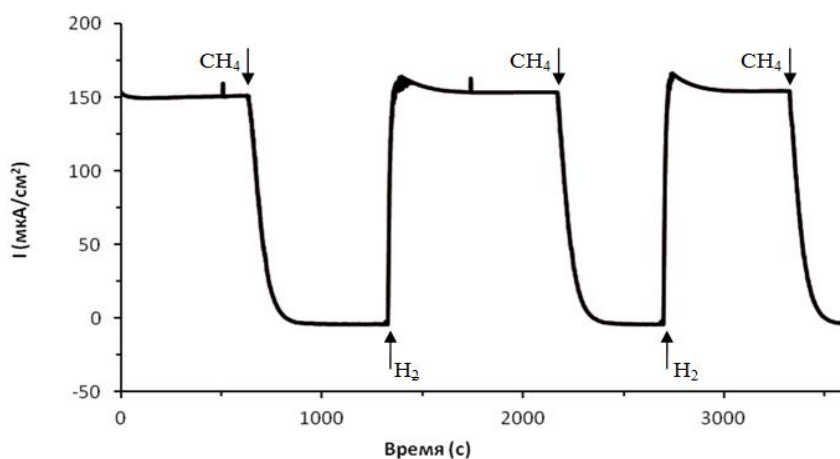


Рис. 5. Зависимость плотности тока от времени в атмосфере водорода и метана для ферментного электрода при потенциале 100 мВ относительно потенциала разомкнутой цепи (0,05 М КН₂РO₄, 0,1 М КСl, 25°С, рН 7).

Как видно из рисунка 5, в атмосфере водорода при заданном потенциале 100 мВ относительно потенциала разомкнутой цепи плотность тока составила 150 мкА/см². При замене водорода на метан при том же значении потенциала анодных токов не наблюдали. Зависимость плотности тока от времени в атмосфере водорода и двуокиси углерода имеет

аналогичный вид (график представлен в полном тексте диссертации). Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о том, что исследуемые газы не вызывают положительных откликов ферментного сенсора, ток при заданном потенциале обусловлен исключительно окислением водорода.

Для оценки ингибирующего действия газов на работу электрода через ячейку пропускали смесь газов - 20% аргона/80% водорода и в амперометрическом режиме задавали различные значения потенциала, фиксируя показания тока окисления водорода, после чего в подаваемой газовой смеси аргон заменяли на исследуемый газ (метан либо CO_2) и проводили те же измерения. Как видно из рисунка 6, в присутствии метана токи окисления водорода практически не менялись. Углекислый газ так же не оказывал ингибирующего действия на работу электрода при всех значениях перенапряжения (график представлен в полном тексте диссертации). Затем, задавая определенное значение напряжения, при барботировании рабочего пространства ячейки той же смесью газов (80% водорода, 20% исследуемого газа) снимали показания тока в течение 60 минут. Длительное воздействие метана и CO_2 на электрод также не вызвало снижения токов окисления водорода.

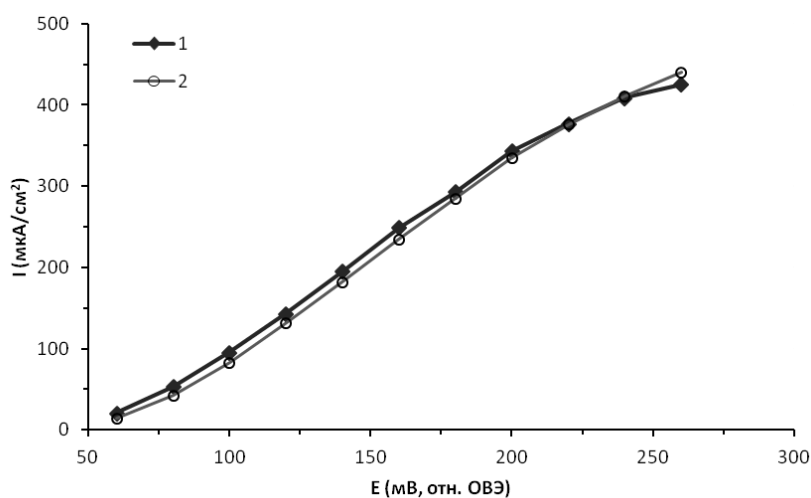


Рис. 6. Влияние метана на токи окисления водорода на ферментном электроде. 1 - 20% аргона и 80% водорода; 2 - 20% метана и 80 % водорода (0,05 М KH_2PO_4 , 0,1 М KCl , 25°C, pH 7).

Таким образом, гидрогеназный электрод устойчив к действию таких продуктов брожения, как метан, двуокись углерода и, как ранее было показано, к сульфиду и угарному газу (Karyakin et al., 2002; Karyakin et al., 2005). Он толерантен к воздействию кислорода (Morozov et al., 2006), устойчив к действию протеолитических ферментов (Kovacs et al., 1988). Такой электрод возможно использовать как чувствительный элемент биосенсора на водород непосредственно в среде культивирования микроорганизмов.

Измерение водорода непосредственно в среде культивирования микроорганизмов

Определение водорода проводили в культуральной жидкости термофильного сахаролитического микроорганизма (штамм №21), основными газообразными метаболитами которого являются водород и двуокись углерода. Поскольку данный микроорганизм является термофильным, измерения проводили при 60°C. Согласно уравнению Нернста, изменение температуры влечет за собой изменение потенциала открытой цепи (ОЦП). При измерении ОЦП в буфере (0,5 М KH_2PO_4 , 0,1 М KCl , pH 7) значение изменилось с -605 мВ до -647 мВ при повышении температуры с 25 до 60°C. Провели измерения плотности тока при 60°C в культуральной жидкости после отделения клеток микроорганизмов. При этом через раствор в течение 5 минут пропускали смесь газов с заданной концентрацией водорода (1%, 2%, 3% и 5%), после чего поток перекрывали и измерения проводили в стационарной системе. Измерения провели при перенапряжении 50 мВ. На рисунке 7 данные представлены в двойной логарифмической системе координат.

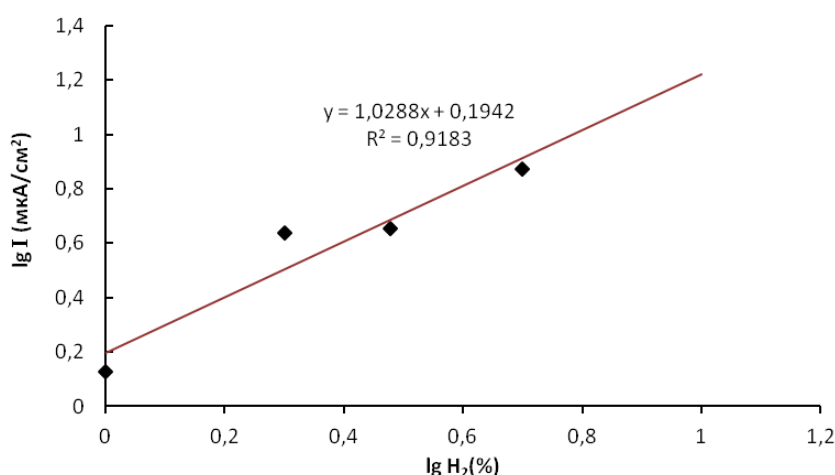


Рис. 7. Зависимость величины плотности тока ($\lg I$) при потенциале 50 мВ относительно потенциала разомкнутой цепи от концентрации водорода ($\lg H_2$) для гидрогеназного электрода (модифицированная среда Имшенецкого, pH 7, 60°C).

В целях проведения эксперимента по определению водорода непосредственно в среде культивирования флакон со свежей питательной средой засеивали (10% посевного) и час инкубировали в термостате при 60°, после чего культуральную жидкость из этого флакона анаэробно вносили в ячейку. Среду продували аргоном в течение 5-10 минут, в ячейке с помощью внешней рубашки поддерживали температуру культивирования в 60°C. Детекцию ОЦП начали после перекрытия потока аргона. Непосредственно после начала измерений наблюдали падение потенциала. Предварительная продувка среды аргоном

исключает возможность падения потенциала за счет водорода, внесенного с посевным материалом. Как видно из рисунка 8, примерно за 40 минут от начала измерений потенциал упал до -450 мВ, затем около 1,5 часов держался примерно на том же уровне, после чего опустился до -590 мВ. Падение потенциала свидетельствует об образовании водорода в среде.

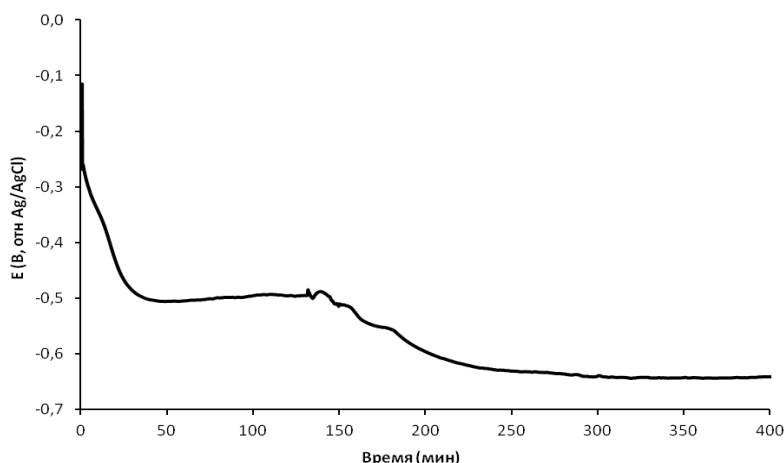


Рис. 8. Временная зависимость величины потенциала разомкнутой цепи в режиме детекции непосредственно в среде культивирования микроорганизмов (модифицированная среда Имшенецкого, pH 7, 60°C).

Через 2 часа культивирования измерили плотность тока при перенапряжении 50 мВ, значение тока составило 4,56 мкА/см². На основании калибровочной кривой провели количественный анализ H₂, который составил 2,8% водорода в газовой фазе и 1,8×10⁻⁵ М водорода в растворе.

Необходимо подчеркнуть, что для определения H₂ может быть применен иной подход. Количество водорода, окисленного на электроде, можно рассчитать через количество электронов, поступивших на электрод. Стоит отметить, что в таких расчетах невозможно оценить поток паразитных утечек электронов. Интегральный анализ зависимости силы тока от времени позволяет получить количество кулонов, прошедших через систему. Зная заряд одного моля электронов (число Фарадея) и учитывая факт, что при окислении одной молекулы водорода на электрод поступает 2 электрона, можно рассчитать количество молей окисленного водорода. Такой метод может быть использован при определении микроколичеств водорода, например, в различных участках кишечника животных и насекомых, участках микробного мата и т.п.

На основании полученных данных можно заключить, что модифицированный гидрогеназный электрод может быть использован для измерения концентрации водорода непосредственно в среде культивирования микроорганизмов.

Заключение

Основная цель данной работы состояла в разработке научных основ технологии получения сенсоров на водород, в основе функционирования которых лежит использование фермента гидрогеназы.

Подобранные и оптимизированные методы длительного хранения позволили получить высокую выживаемость штамма-продуцента. Показано, что для *T. roseopersicina* BBS применимо хранение при низких температурах (-80 °C) – метод более экономически выгодный в сравнении с рекомендуемым для пурпурных серных бактерий хранением в жидком азоте (The Prokaryotes..., 2006; Bergey's..., 2009). Поскольку литературных данных о лиофилизации пурпурных бактерий мало и они противоречивы (Malik, 1990; Bergey's..., 2009; Kupletskaya, Netrusov, 2011), исследована возможность хранения *T. roseopersicina* BBS в лиофильно высушенной форме. Показано, что после лиофилизации концентрация жизнеспособных клеток снизилась меньше, чем на порядок.

В работе был использован кинетический аппарат, позволивший оценить динамику выживаемости клеток в процессе хранения. Данные, полученные на основе кинетического анализа, были подтверждены экспериментально анализом выживаемости культуры после хранения в течение года. Рассчитано, что при подобранных условиях лиофильного высушивания и исходной концентрации клеток непосредственно после лиофилизации $(2 \pm 0,5) \times 10^8$ кл/мл после 10 лет хранения количество жизнеспособных клеток останется в пределах $10^4 - 10^3$ кл/мл.

Выбранные и усовершенствованные методики выделения и очистки гидрогеназы позволили получить высокостабильный и активный препарат фермента с удельной активностью, не уступающей известным литературным аналогам (38 и 43,3 мкмоль H_2 /мин · мг белка; Задворный и др., 2004; Zadvorny et al., 2006). Установлена возможность замены конечной ступени очистки фермента – препаративного электрофореза на хроматофокусирование. Ранее было показано, что при использовании для изготовления электродов препаратов фермента, не прошедших эту стадию очистки, максимальная активность электродов была в 3 раза ниже (Воронин, 2010). В работе, заменив препаративный электрофорез на хроматофокусирование, получили функционирующий гидрогеназный электрод с активностью, сопоставимой с активностью электродов, полученных на основе ферментного препарата, прошедшего стадию электрофореза. Резюмируя, можно заключить, что очистку фермента возможно масштабировать, используя препаративную высокоэффективную жидкостную хроматографию. Замена стадии препаративного электрофореза не скажется на характеристиках электродов.

Изготовлен высокоактивный водородный ферментный электрод. В предложенной конструкции электрода фермент иммобилизован, нет необходимости добавления в раствор медиаторов, возможна миниатюризация электрода и упрощения процесса измерения за счет использования технологии трафаретной печати. Это дешевый и простой в исполнении метод обеспечивает простоту массового производства, высокую воспроизводимость получаемого продукта и низкую стоимость, что дает возможность одноразового применения сенсорных структур.

Предложена трехэлектродная схема измерений. Показана принципиальная возможность применения измерения концентрации H_2 с помощью ферментного электрода на основе гидрогеназы *T. roseopersicina* BBS. Сенсор функционирует в двух режимах детекции – потенциометрическом и амперометрическом.

Выявлено отсутствие влияния на работу гидрогеназного электрода углекислого газа и метана - одних из основных газовых метаболитов анаэробных микроорганизмов. В совокупности с ранее полученными данными, что гидрогеназный электрод устойчив к ингибиторному действию сульфида и угарного газа (Karyakin et al., 2002, Karyakin et al., 2005), устойчив к действию протеолитических ферментов (Kovacs et al., 1988), наши данные свидетельствуют о возможности применения разрабатываемого сенсора непосредственно в среде культивирования микроорганизмов. Показана принципиальная возможность детекции H_2 непосредственно в процессе культивирования анаэробных микроорганизмов.

Разработанные научные основы технологии создания биосенсора на водород могут быть использованы в дальнейшем для разработки и производства водородных биосенсоров различной конструкции для применения в различных сферах деятельности человека от промышленности и медицины до научных исследований.

ВЫВОДЫ

1. Подобраны методы консервирования культуры, обеспечивающие получение стабильного коллекционного материала и длительное хранение *Thiocapsa roseopersicina* BBS. Показана применимость кинетического аппарата (теста на ускоренное хранение) в анализе выживаемости клеток *T. roseopersicina* BBS в процессе хранения. Расчетное время хранения культуры не менее 10 лет.
2. С использованием двух методик очистки и выделения получены высокоочищенные препараты HynSL-гидрогеназы *Thiocapsa roseopersicina* BBS с активностями 38 и 43,3 мкмоль H₂/мин · мг белка.
3. Сконструированный ферментный электрод на основе HynSL-гидрогеназы *T. roseopersicina* BBS способен эффективно функционировать как биосенсор в различных режимах и средах.
4. Показана возможность использования разработанного электрода для анализа H₂ непосредственно в среде культивирования микроорганизмов.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

Статьи в рецензируемых журналах, входящих в список ВАК РФ:

- 1) Кошкарлова Л.А., Воронин О.Г., Абрамов С.М., Шестаков А.И., Нетрусов А.И. Влияние метана и двуокиси углерода на работу ферментного электрода на основе гидрогеназы. // Биотехнология. - 2015. - № 6. - с.86-91.
- 2) Садрадинова Э.Р., Шестаков А.И., Абрамов С.М., Кошкарлова Л.А., Митрофанова Т.И., Василев Р.Г., Нетрусов А.И. Скрининг микробных сообществ - продуцентов биоводорода. // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. - 2013. - Т.9(2). - с.43-52.
- 3) Садрадинова Э.Р., Шестаков А.И., Абрамов С.М., Федосова В.И., Кошкарлова Л.А., Митрофанова Т.И., Василев Р.Г., Нетрусов А.И. Влияние различных факторов на эффективность процесса термофильной микробной конверсии органических отходов в биоводород. // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. - 2013.- Т. 9(2). - с.52-63.

Другие публикации:

- 1) Кошкарлова Л.А., Конищева Е.В. Микробная конверсия органических отходов в электроэнергию с помощью гидрогеназного электрода, интегрировано в среду ферментации. // Материалы восьмой всероссийской научной молодежной школы с международным участием «Возобновляемые источники энергии». Москва, 2012, с.200-201.
- 2) Абрамов С.М., Быконя Е.Н., Кошкарлова Л.А., Садрадинова Э.Р., Воронин О.Г., Шестаков А.И., Карякин А.А., Нетрусов А.И. Электричество из отходов: микробная возобновляемая энергия. // Материалы международного форума Reenfor-2013 «Возобновляемая энергетика. Пути повышения энергетической и экономической эффективности». Москва, 2013, с. 24-26.
- 3) Кошкарлова Л.А. Влияние метана и двуокиси углерода на работу ферментного электрода на основе гидрогеназы. // Сборник тезисов XXVII зимней молодежной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Москва, 2015, с.133.
- 4) Кошкарлова Л.А., Воронин О.Г. Разработка биосенсора на основе гидрогеназы для детекции водорода. // Сборник тезисов XXII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2015: Секция «Биология». Москва, 2015, с.221.
- 5) Кошкарлова Л.А., Шестаков А.И., Нетрусов А.И. Лиофилизация как метод длительного хранения пурпурной серной бактерии *Thiocapsa roseopersicina* BBS. //

Материалы конференции «Автотрофные микроорганизмы: 5-й Всероссийский симпозиум с международным участием». Москва, 2015, с.500.

6) Динариева Т.Ю., Кошкарова Л.А., Кант Й., Нетрусов А.И. Выделение и очистка термостабильной гидрогеназы из пурпурной серной бактерии *Thiocapsa roseopersicina* BBS. // Материалы конференции «Автотрофные микроорганизмы: 5-й Всероссийский симпозиум с международным участием». Москва, 2015, с.400.

7) Кошкарова Л.А. Долговременное хранение пурпурной серной бактерии *Thiocapsa roseopersicina* BBS. // Сборник тезисов XXIII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016: Секция «Биология» Москва, 2016.

8) Koshkarova L., Shestakov A., Netrusov A. Long-term storage of *Thiocapsa roseopersicina* BBS. // Photosynthesis Research for Sustainability. Pushchino, 2016. p.206.