ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА И ЦИТОХРОМОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В МЕМБРАННОЙ ФРАКЦИИ БАКТЕРИЙ GLUCONOBACTER OXYDANS СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Тимченкова Снежана Петровна

студент, Смоленский государственный университет, естественно-географический факультет, РФ, г. Смоленск

Аннотация. В данной статье рассматривается процесс выделения и оценки цитохром-с-оксидазной активности ферментного препарата мембранных фракций, полученных из биомассы бактерий G. oxydans. Отмечается важность участия цитохромоксидазы в переносе электронов, измеряется ее активность на всех стадиях получения мембранной фракции. Разработана методика получения мембранных фракций бактерий Gluconobacter oxydans для использования их в биосенсорах и биотопливных элементах.

Ключевые слова: бактерии, биотопливный элемент, энергия, фермент, катализатор.

Биотопливный элемент (БТЭ) – это устройство, которое преобразует энергию микробного метаболизма или каталитическую энергию ферментов в электричество, благодаря биокаталитическому окислению органических и неорганических веществ [1].

Для БТЭ, в отличие от химических топливных элементов, в качестве топлива можно использовать углеводы, органические кислоты, спирты и многие органические отходы [4]. Это энергетически выгодно и экологически безопасно.

В БТЭ в качестве катализаторов применяют либо целые микроорганизмы, либо ферментные препараты [2]. Ферменты обладают значительно более высокой каталитической активностью по сравнению с целыми клетками. Но конечная стоимость используемого биокатализатора значительно возрастет из-за процесса выделения индивидуальных ферментов. Мембранная локализация основных катаболических ферментов бактерий *Gluconobacter oxydans* позволяет использовать их мембранную фракцию в качестве биокатализатора, что может служить альтернативой применения ферментов [3].

Получение мембранной фракции представляет собой последовательное центрифугирование разрушенных ультразвуком клеток бактерий. Ферментный препарат с наибольшим содержанием мембранной фракции позволит повысить эффективность работы БТЭ.

Цитохром-с-оксидаза – конечный компонент дыхательной цепи всех аэробных организмов. Цитохромоксидаза объединяет в себе свойства нескольких металлопротеинов, выполняющих транспортные или окислительно-восстановительные функции для осуществления более сложной комбинации процессов, включающих связывание и восстановление кислорода и транспорт электронов и протонов. Реальные механизмы этих реакций в настоящее время интенсивно изучаются.

Учитывая всю важность участия цитохромоксидазы в переносе электронов, целесообразно измерить ее активность на всех стадиях получения мембранной фракции.

На первом этапе работы проводится получение ферментного препарата, содержащего различные мембранные ферменты бактерий *G. oxydans*. Культивирование бактерий *G. oxydans* производится на питательной среде следующего состава: D-сорбит и дрожжевой экстракт, при температуре 28 ^{o}C, в течение 18-20 часов. Получение мембранной фракции бактерий проводится путем разрушения бактерий *G. oxydans* с использованием ультразвукового диспергатора. Полученный лизат центрифугируют 40 минут при 6500g, данные условия предполагают оседание клеточного крупного дебриса. На второй стадии центрифугирование проводится в течение 30 минут при 15000g, что вызывает преимущественное оседание мембранных фракций.

В результате первого центрифугирования получают осадок массой 508 мг и надосадочную жидкость объёмом 15 мл. Масса мембранной фракции, полученная в ходе второй стадии центрифугирования, составляет около 400 мг, объём надосадочной жидкости составляет 12 мл. Предполагается, что мембрансвязанные ферменты находятся как в надосадочной жидкости, так и в осадке, поэтому дальнейшую работу, а именно, количественное определение белка и измерение активности цитохром-с-оксидазы проводят на всех стадиях выделения с каждым из ферментных препаратов.

Для количественного определения белка в ферментных препаратах мембранных фракций используется метод Лоури. В пробе мембранной фракции, полученной после первого центрифугирования, содержание белка в осадке составляет – 155 мг, в надосадочной жидкости – 492 мг. В пробе, полученной после второго центрифугирования – 111 мг в осадке, в надосадочной жидкости – 364 мг.

Таким образом, большая часть белка после первого центрифугирования остается в надосадочной жидкости. При дальнейшем центрифугировании большинство белка также остается в надосадочной жидкости. С целью повышения количества белка в осадке предполагается увеличить скорость центрифугирования.

На следующем этапе данной работы производится определение активности цитохромоксидазы в ферментных препаратах. Активность цитохромоксидазы определяется по скорости окисления цитохрома с гемопротеиновыми ферментами (цитохромоксидаза) спектрофотометрическим методом при длине волны 550 нм. Полученные данные приведены на графике, представленном на рисунке1.

Показателем активности служит величина падения оптической плотности раствора за определённый промежуток времени (14,8 мин). Измерения проводятся на каждой стадии центрифугирования в обеих ферментных фракциях.

Рисунок 1. График зависимость падения оптической плотности от времени

После первого центрифугирования получили следующие результаты: активность фермента в . После второго центрифугирования активность цитохромоксидазы в надосадочной жидкости составила

, а в осадке – 0,0038±0,0003. Активность в осадке после второго центрифугирования по отношению к надосадочной жидкости больше в 1,7 раза.

Таким образом, поскольку после центрифугирования на 150000g в осадке отсутствует, а в надосадочной жидкости составляет 0,0022±0,0001 часть белка остается в надосадочной жидкости, необходима оптимизация способа получения мембранной фракции с целью получения более эффективного ферментного препарата.

Список литературы:

1. Казаринов И. А., Кузьмичева Е. В. Микробные топливные элементы новое направление в развитии альтернативной энергетики // Автономная энергетика – 2009. – №26. – С. 37-47.

2. Frank Davis, Seamus P. J. Higson. Biofuel cells – Recent advances and applications // Biosensors and Bioelectronics. – 2007 – № 22. – P. 1224-1235.

3. Hong Liu, Shaoa Cheng, Bruce E. Logan Power Generation in Fed-Batch Microbial Fuel Cells as a Function of Ionic Strength, Temperature, and Reactor Configuration // Environ. Sci. Technol. – 2005. – P. 5488-5493.

4. Rahimnejad M., Adhami A., Darvari S., Zirepour A., Sang-Eun Oh. Microbial fuel cell as new technology for bioelectricity generation: A review // Alexandria Engineering J. – 2015. – V. 54. – № 3. – P. 745-756.