

УДК 543.9:579.6+543.55

СВОЙСТВА МОДИФИЦИРОВАННЫХ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИХ БИОСЕНСОРОВ НА ОСНОВЕ МЕТАНОЛДЕГИДРОГЕНАЗЫ И КЛЕТОК *Methylobacterium nodulans*

© 2013 г. Т. А. Кузнецова**, А. П. Бесчастный*, С. В. Алфёров**, Ю. А. Троценко*

* Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушино, 142290

** Тульский государственный университет, Тула, 300600

e-mail: trotsenko@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 26.04.2013 г.

Исследованы свойства амперометрических биосенсоров на основе метанолдегидрогеназы (МДГ), а также клеток *Methylobacterium nodulans* и графито-пастового электрода, модифицированного ферроценом (ФЦ). Показано, что внесение гидроксиапатита (ГА) в графитовую пасту повышало чувствительность и операционную стабильность МДГ-биосенсора. Линейный диапазон электрода составил: для метанола 0.0135–0.5 мМ, для формальдегида 0.032–1.5 мМ. Предел обнаружения метанола – 4.5, формальдегида – 11.0 мкМ. Потеря активности электрода в течение 10 сут хранения в присутствии 2.0 мМ KCN не превышала 12%. Цианид (10 мМ) полностью ингибировал ответы сенсора на формальдегид (1.0 мМ), что позволяло селективно определять метанол в присутствии формальдегида. Биосенсор на основе клеток обладал меньшей стабильностью и чувствительностью по отношению к метанолу и формальдегиду: коэффициенты чувствительности – 980 и 21 нА/мМ соответственно.

DOI: 10.7868/S055510991306010X

Пирролохинолинхинон (ПХХ) – зависимая метанолдегидрогеназа (МДГ, КФ 1.1.2.7), присутствующая исключительно у аэробных метилотрофных бактерий [1], является перспективным биокатализатором электрохимических сенсоров для чувствительного и недорогого метода определения метанола. Как известно, МДГ, прочно связанная с ПХХ, катализирует рН-зависимую двух-электронную реакцию окисления метанола до формальдегида при низких положительных потенциалах, что отличает данный фермент от НАД-зависимой алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.1.1). Другим важным преимуществом МДГ является независимость реакции от кислорода в отличие от ФАД-алкогольоксидазы дрожжей (КФ 1.1.3.13) [1–4].

Применение МДГ в биоэлектрокатализе отражено в научной литературе весьма фрагментарно. Так, на основе МДГ *Methylobacterium (Pseudomonas) extorquens* был разработан биотопливный элемент, анодный компартмент которого использовался как кулонометрический детектор первичных спиртов [5]. Также МДГ *Methylobacterium extorquens* AM1, иммобилизованная на графито-пастовом электроде, применялась для амперометрической детекции аммония в присутствии медиатора электронного транспорта – феназинметосульфата (ФМС). Электрод сохранял 50% активности через 15 сут [6]. Кроме того, МДГ *M. extorquens* AM1, иммобилизованную на поверхно-

сти стеклоуглеродного электрода, использовали для амперометрической детекции метанола. Наилучшие показатели были получены с ферроценом (ФЦ) в качестве медиатора [7].

В этих экспериментах при каждом измерении в кювету вносили медиаторы электронного транспорта из-за неспособности МДГ передавать электроны от активного центра к поверхности электрода. В связи с этим представляют интерес работы на основе электропроводящей ион-радикальной соли тетраафульвален-тетрацианохинониметана и МДГ *Methylophilus methylotrophus* [8, 9], а также МДГ *Paracoccus denitrificans* [9]. Данные электроды обеспечивали транспорт электронов в отсутствие медиаторов.

За исключением единственной работы, графито-пастовые электроды не применялись для МДГ-биосенсора [6]. Возможно, это вызвано трудностью иммобилизации гидрофильной МДГ на гидрофобной поверхности графито-пастового электрода, что негативно влияет на чувствительность и стабильность биосенсора [10–12]. Однако известны модификации графито-пастовых электродов, придающие им гидрофильность [10, 13]. Так, недавно графито-пастовые электроды, модифицированные гидроксиапатитом (ГА), были использованы для электрохимического определения тяжелых металлов [14–16], *p*-нитрофенола [17] и параквата [18]. При этом ГА значительно улучшал аналитические характеристики электро-

дов, благодаря уникальным сорбционным свойствам и гидрофильности, что используется при хроматографии белков и нуклеиновых кислот, включая очистку МДГ из различных метиловых бактерий [11, 12, 19]. Ранее нами было показано, что внесение ГА в графитовую пасту улучшало характеристики биосенсора на основе МДГ *Methylobacterium nodulans* [19].

Цель работы — исследование свойств и оптимизация медиаторного амперометрического биосенсора метанола на основе МДГ *M. nodulans* и графито-пастового электрода, модифицированного ФЦ и ГА в сравнение с аналогичным сенсором на основе клеток метиловых бактерий.

МЕТОДИКА

Выращивание бактерий, выделение и очистку МДГ из *M. nodulans* ORS2060T осуществляли по ранее описанной схеме [19]. Удельная активность препарата МДГ составляла 3.9 ед./мг белка, концентрация — 6.7 мг/мл.

Рабочий электрод готовили, наполняя графитовой пастой пластиковую трубку диаметром 3 и высотой — 95 мм. Графитовую пасту готовили смешиванием следующих компонентов: 40–90 мг графитовой пудры (“Fluka”, Германия), 0–50 мг ГА (“Bio-Rad”, США), 10 мг ФЦ (“Aldrich”, Германия) и 40 мкл парафинового масла (“Fluka”, Германия) в агатовой ступке. Трубка содержала серебряную проволоку для электрического контакта с частицами графита. На поверхность электрода (площадь 7.1 мм²) наносили 10 мкл раствора МДГ в 20 мМ калий-фосфатном буфере (КФБ), pH 7.0, или 5 мкл суспензии клеток (200 мг/мл) и подсушивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Поверхность электрода накрывали диализной мембраной с размером пор 14 кДа (“Sigma”, США), закрепляя ее пластиковым кольцом. МДГ-электрод до использования хранили при +4°C в 50 мМ КФБ (pH 7.0) и 2.0 мМ KCN.

Амперометрические измерения проводили при 20°C в двухэлектродной ячейке при потенциале 250 мВ и непрерывном перемешивании (300 об/мин). Рабочим электродом служил модифицированный ФЦ и ГА графито-пастовый электрод с иммобилизованными клетками или МДГ. Электрод сравнения — хлорсеребряный. Если не указано особо, электролитическую ячейку заполняли 3.95 мл 50 мМ КФБ, pH 8.0, содержащего 15 мМ NH₄Cl, 2 мМ KCN для МДГ-электрода и 3.95 мл 50 мМ КФБ, pH 7.2, для микробного электрода и 50 мкл раствора метанола или формальдегида необходимой концентрации.

За ответ сенсора принимали величину разности силы тока ($\Delta I = I - I_0$) до внесения (I_0) и после внесения (I) субстрата в измерительную кювету. После регистрации ответа сенсора промывали

ячейку рабочим буферным раствором для МДГ, pH 8.0, и для клеток — pH 7.2. Регистрацию циклических вольтамперограмм проводили в трехэлектродной ячейке. Рабочим электродом являлся модифицированный графито-пастовый, вспомогательным — платиновый и электродом сравнения — хлорсеребряный.

Все электрохимические измерения и регистрацию данных проводили с помощью гальванопотенциостата IPC2000 (“Кронас”, Москва), сопряженного с компьютером с программным обеспечением IPC-Micro 8.65 (“Кронас”, Москва) для Windows XP. Диапазон регистрируемых токов 1 нА — 10 мА. Ошибка измерения потенциала не более 0.1 мВ для интервала ± 5 В.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Благодаря стабильности, МДГ *M. nodulans* является одним из наиболее перспективных биокатализаторов амперометрического биосенсора спиртов, в частности, на основе дешевого, безопасного для окружающей среды и простого в изготовлении графито-пастового электрода [19]. Однако МДГ *M. nodulans* при потенциалах до 600 мВ не способна передавать электроны на графито-пастовый электрод в отсутствие медиатора электронного транспорта, подобно аналогичным ферментам [5–7]. Поэтому графитовую пасту модифицировали ФЦ, как эффективным, нечувствительным к кислороду и свету медиатором МДГ [7]. Тем не менее, в присутствии ФЦ в пасте от 5.0 до 20% и иммобилизованной МДГ (0.25 Е) ответы сенсора на метанол в насыщающей концентрации (12.5 мМ) при pH 9.0 в 0.05 М КФБ в присутствии 15 мМ NH₄Cl не превышали 0.6 мкА.

Поскольку в процессе очистки МДГ *M. nodulans* было установлено, что фермент прочно связывается с ГА, это вещество добавляли в графитовую пасту для улучшения характеристик электрода [19]. Присутствие Ca²⁺ в графитовой пасте также могло стабилизировать фермент, так как данный ион обнаружен в активном центре МДГ [20].

Предварительно нами было исследовано влияние ГА на окислительно-восстановительные свойства ФЦ методом циклической вольтамперометрии в трехэлектродной системе. Повышение содержания ГА (10–50%) в пасте не влияло на величину потенциалов анодного и катодного пиков ФЦ, но приводило к пропорциональному увеличению соответствующих токов, что, очевидно, вызвано наличием ионогенных групп в ГА. Следовательно, ГА не влиял на обратимость окислительно-восстановительной системы “ферроцен-катион ферроцена” (рис. 1).

В дальнейшей работе использовали графитовую пасту с 30%-ной концентрацией ГА, обеспечивающей приемлемую величину начального то-

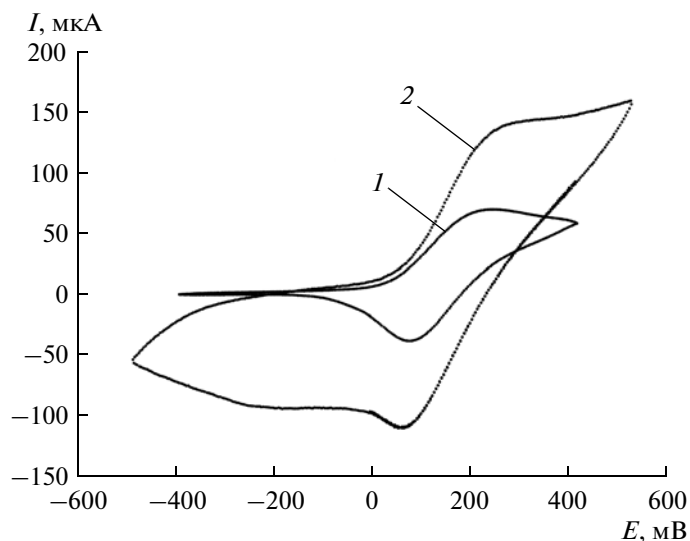


Рис. 1. Вольтамперные зависимости графитового электрода, модифицированного: 10% ФЦ (1), 10% ФЦ и 30% ГА (2).

ка при выраженном влиянии на эффективность электрода. После иммобилизации МДГ (0.25 ед.) на поверхности электрода, содержащего в графитовой пасте 30% ГА и 10% ФЦ, ответ биосенсора на метанол увеличился в 10 раз относительно пасты без ГА при одинаковых условиях измерения (рис. 2).

В отсутствие NH_4Cl биосенсор не реагировал на метанол, что согласуется с ранее полученными данными [6, 7, 9].

Зависимость активности биосенсоров от рН среды определяли в 0.05 М КФБ, содержащем 15 мМ NH_4Cl и оттитрованным концентрированной HCl или 5.0 М NaOH до рН 6–10. Изучение зависимости ответов сенсора на основе клеток от значений рН среды показало, что максимальная скорость ответа приходилась на значение рН 7.2 (рис. 3), что соответствовало оптимуму рН для роста этого штамма.

Максимальная чувствительность МДГ-биосенсора проявлялась в щелочной области (рН 9–10), что соответствовало ранее полученным данным для этого фермента в условиях измерения *in vitro* с ФМС [19]. Однако ФЦ, в отличие от ФМС, обеспечивал активность МДГ в более широком диапазоне рН. Так, при рН 7.0 биосенсор проявлял более половины максимальной активности, что представляет определенный интерес для биоаналитических целей. Поскольку при рН выше 9.0 фермент характеризовался меньшей стабильностью, дальнейшую работу проводили при рН 8.0.

Следовательно, применение клеток в качестве биокатализатора амперометрического сенсора позволяло выполнять анализ лишь в узком диапазоне рН, при этом незначительные колебания рН среды могут существенно снизить его чувствительность, тогда как расширенный диапазон рН МДГ-сенсора допускал проведение измерений в широком диапазоне рН практически без потери активности.

Операционную стабильность биосенсора оценивали на основании статистической обработки выборок из нескольких последовательных изме-

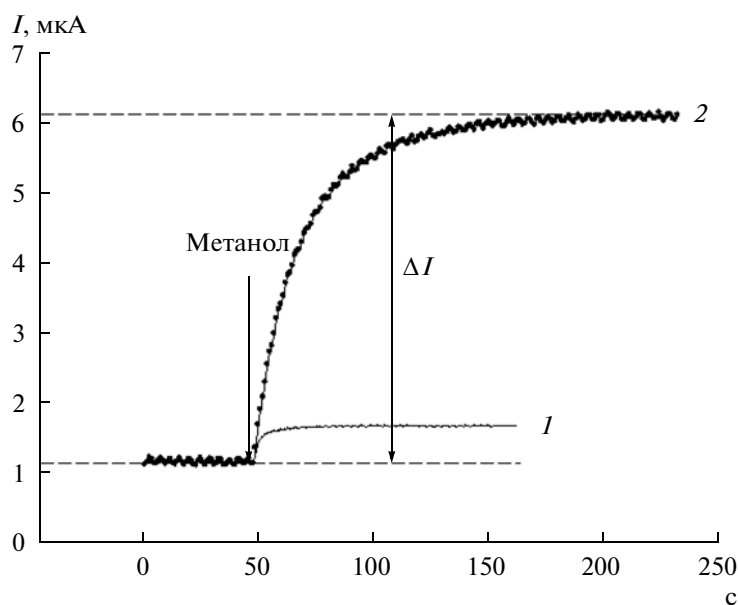


Рис. 2. Ответы на метанол (12.5 мМ) медиаторного (10% ФЦ) биосенсора с иммобилизованной МДГ (0.25 Е) без ГА (1) и в присутствии 30% ГА (2).

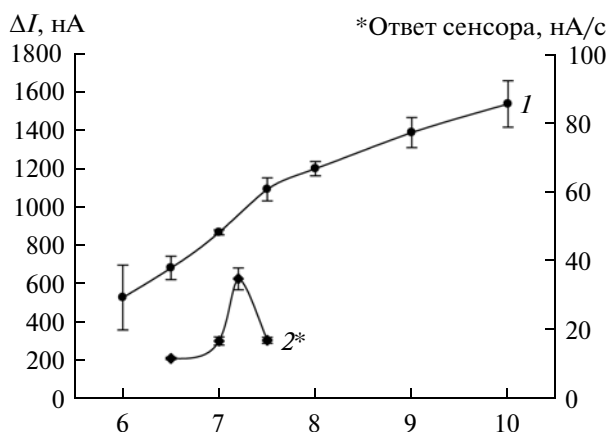


Рис. 3. Влияние pH на активность биосенсора на основе МДГ (1 – 1.25 мМ метанол) и клеток (2 – 6.25 мМ метанол).

рений концентрации метанола. Присутствие в графитовой пасте 30% ГА также приводило к увеличению операционной стабильности МДГ-биосенсора. При использовании графитовой пасты без ГА, ответы биосенсора снижались практически до нуля в течение пяти измерений (рис. 4).

Относительное стандартное отклонение ответов сенсора на основе ферментного электрода, содержащего 30% ГА, составляло 8.6% ($P = 0.95$ и $n = 8$). Так как цианид калия является стабилизатором МДГ [11, 12], в отдельном опыте KCN использовали в качестве добавки к рабочему буферному раствору для МДГ-электрода, модифицированного 30%-ным ГА. При этом отмечалось

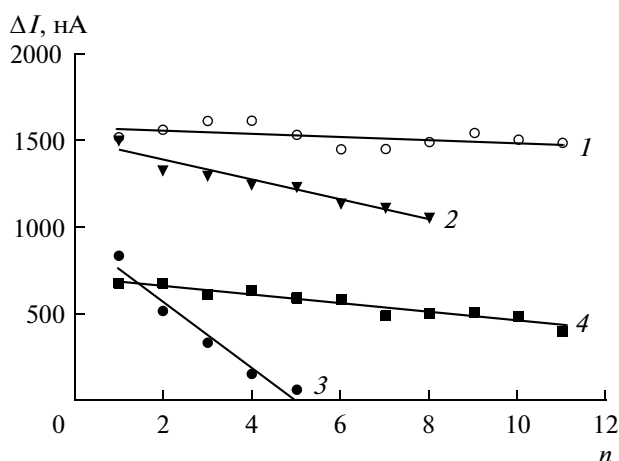


Рис. 4. Операционная стабильность биосенсоров на метанол (1.25 мМ):

1 – МДГ-электрод, модифицированный 30% ГА и 10% ФЦ в присутствии 2 мМ KCN; 2 – аналогичный электрод в отсутствие цианида; 3 – МДГ-электрод без ГА с 10% ФЦ, 4 – электрод на основе клеток метилобактерий, модифицированный 10%-ным ФЦ в присутствии 6.25 мМ метанола. n – число измерений.

улучшение операционной стабильности биосенсора: относительное стандартное отклонение ответов сенсора составляло 4.0% ($P = 0.95$; $n = 11$). Биосенсор на основе клеток был менее стабилен (рис. 4): относительное стандартное отклонение ответов сенсора – 15% ($P = 0.95$; $n = 11$). Вероятно, ФЦ ингибировал ферментные системы клеток или оказывал на них токсическое воздействие.

В присутствии 30%-ного ГА в графитовой пасте увеличивалась чувствительность и операционная стабильность МДГ-биосенсора. Добавление 2 мМ KCN к рабочему буферному раствору дополнительно стабилизировало биосенсор.

Определение биосенсором содержания метанола в культуральной среде метилотрофов осложняется присутствием формальдегида, который тоже является субстратом МДГ [11, 12, 19], поэтому исследовали характеристики биосенсоров на метанол и формальдегид. Зависимость силы тока от концентрации метанола и формальдегида была гиперболической, что обусловлено биокаталитической природой анализируемого сигнала (рис. 5).

Зависимости откликов биосенсора от концентрации метанола или формальдегида аппроксимировали уравнением Михаэлиса–Ментен [21]. Для определения характеристик использовали линейные участки градуировочных зависимостей.

Линейный диапазон определяемых концентраций метанола с помощью сенсора на основе МДГ *M. nodulans* составлял от 0.0135 до 0.5 мМ, формальдегида – 0.032–1.5 мМ; для сенсора на основе клеток – от 0.09 до 0.33 мМ метанола и от 0.4 до 8 мМ формальдегида.

Длительность единичного измерения, в которую входило развитие отклика сенсора и регенерация электрода, не превышала 10 мин для обоих типов биокатализаторов. Характеристики медиаторных биосенсоров на основе МДГ и клеток метилобактерий приведены в таблице.

Параметры МДГ-биосенсора (коэффициенты чувствительности, пределы обнаружения метанола и формальдегида) различались незначительно, что указывало на невозможность селективного определения данных соединений при совместном присутствии. Напротив, коэффициенты чувствительности микробного сенсора по отношению к исследуемым субстратам различались на порядок, что позволяло определять концентрацию метанола в присутствии до 0.14 мМ формальдегида.

Изучение долговременной стабильности биосенсоров выявило значительное превосходство МДГ-электрода относительно сенсора на основе клеток. Модификация графитовой пасты 30%-ным ГА и внесение 2.0 мМ KCN в буфер позволили снизить потери активности сенсора до 12 % в течение 10 сут. Низкая стабильность микробного сенсора может быть обусловлена негативным действи-

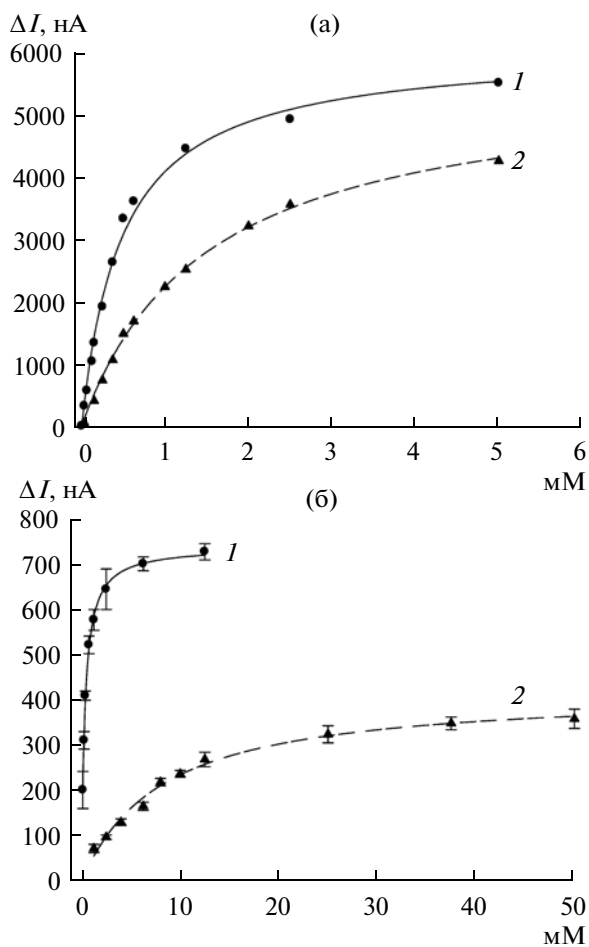


Рис. 5. Зависимость откликов биосенсора, от концентрации метанола (1) и формальдегида (2) на основе МДГ (а) 0.25 ед.) и клеток метилобактерий (б).

ем ФЦ на клетки метилобактерий, что показано при изучении его операционной стабильности. Сравнительный анализ характеристик биосенсоров подтвердил преимущество сенсора на основе МДГ *M. nodulans* по основным метрологическим параметрам (таблица). Однако для селективного определения метанола необходимо подавить отклик сенсора на формальдегид.

Параметры медиаторного биосенсора на основе МДГ и клеток *M. nodulans*

Параметр	МДГ		Клетки	
	метанол	ФА	метанол	ФА
Коэффициент чувствительности, нА/мМ	7200 ± 300	3000 ± 50	980 ± 90	21 ± 1
Предел обнаружения, мМ	0.0045	0.011	0.03	0.14
Верхняя граница линейного диапазона определяемых концентраций (K_M), мМ	0.49 ± 0.03	1.5 ± 0.1	0.33 ± 0.02	8 ± 1
Стабильность, потеря активности за 10 сут, %	12		90	

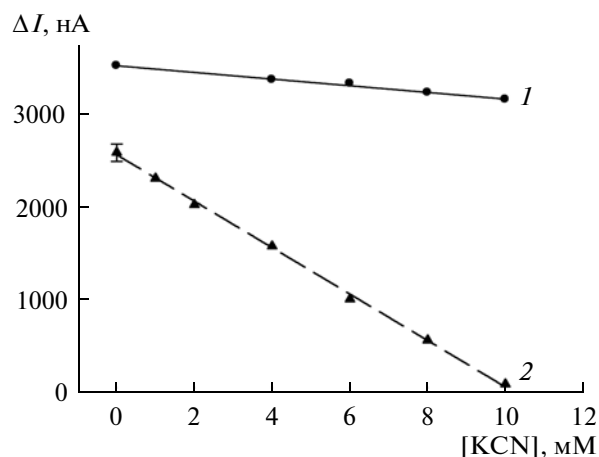


Рис. 6. Зависимость откликов биосенсора с МДГ от концентрации KCN в присутствии 1.25 мМ метанола (1) и 1.25 мМ формальдегида (2).

Известно, что цианид, образуя аддукт с ПХХ, является конкурентным ингибитором МДГ [11]. В присутствии 2.0 мМ KCN наблюдали значительные различия кажущихся значений K_M МДГ *M. nodulans* к метанолу и формальдегиду – 0.23 мМ и 7.2 мМ, соответственно [19]. Еще более значительно различалась степень ингибирования ответов МДГ-электрода на метанол и формальдегид при увеличении концентрации цианида до 10 мМ (рис. 6). При этом происходило практически полное ингибирование ответов сенсора на ФА, тогда как окислительная активность иммобилизованной МДГ к метанолу снижалась незначительно.

Таким образом, нами показано, что МДГ *M. nodulans* является эффективным биокатализатором амперометрического медиаторного графитопастового сенсора. Использование ГА для модификации графитовой пасты обеспечивает высокие каталитические токи окисления метанола и увеличение стабильности биосенсора. Цианид также стабилизирует данный сенсор и позволяет селективно определять метанол в присутствии формальдегида. Модифицированный амперометрический МДГ-биосенсор, будучи экономичным и простым в изготовлении, не уступает, а по некото-

рым аналитическим и метрологическим характеристикам превосходит другие биосенсоры для определения содержания метанола [22–24]. Использование клеток метиловых бактерий в качестве биокатализатора во многом облегчает проведение биосенсорного анализа, поскольку исключает трудоемкую стадию очистки фермента. Однако микробный сенсор значительно уступает по стабильности и чувствительности электроду на основе очищенной МДГ.

Работа выполнена при поддержке гранта ФЦП 14.В37.21.0561.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Троценко Ю.А., Доронина Н.В., Торгонская М.Л. Аэробные метиловых бактерии. / Ред. В.Ф. Гальченко. Пушино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2010. 325 с.
2. Гвоздев А.Р., Тухватуллин И.А., Гвоздев Р.И. // Биохимия. 2012. Т. 77. № 8. С. 1017–1032.
3. Ikeda T., Kano K. // Biochim. Biophys. Acta. 2003. V. 1647. № 1–2. P. 121–126.
4. Misra H.S., Rajpurohit Y.S., Khairnar N.P. // J. Biosci. 2012. V. 37. № 2. P. 313–325.
5. Davis G., Hill H.A.O., Aston W.J., Higgins I.J., Turner A.P.F. // Enzyme Microb. Technol. 1983. V. 5. № 5. P. 383–388.
6. Suye S., Nakamura Y., Inuta S., Ikeda T., Senda M. // Biosens. Bioelectron. 1996. V. 11. № 5. P. 529–534.
7. Liu Q., Kirchhoff J.R. // J. Electroanal. Chem. 2007. V. 601. № 1–2. P. 125–131.
8. Zhao S., Lennox R.R. // Anal. Chem. 1991. V. 63. P. 1174–1178.
9. Loughran M.G., Hall J.M., Davidson V.L., Turner A.P.F. // The Analyst. 1996. V. 121. № 11. P. 1711–1715.
10. Švancara I., Vytrás K., Kalcher K., Walcarious A., Wang J. // Electroanalysis. 2009. V. 21. № 1. P. 7–28.
11. Frank J., Duine J.A. // Methods Enzymol. 1990. V. 188. P. 202–209.
12. Day D.J., Anthony C. // Methods Enzymol. 1990. V. 188. P. 210–216.
13. Parellada J., Narváez A., Dominguez E., Katakis I. // Biosens. Bioelectron. 1997. V. 12. № 4. P. 267–275.
14. El Mhammedi M.A., Achakb M., Chtainia A. // J. Hazardous Materials. 2009. V. 161. P. 55–61.
15. Zhang Y., Liu Y., Ji X., Banks C.E., Zhang W. // J. Mater. Chem. 2011. V. 21. P. 7552–7554.
16. Zhang Y., Liu Y., Ji X., Banks C.E., Zhang W. // Chem. Commun. 2011. V. 47. P. 4126–4128.
17. El Mhammedi M.A., Achakb M., Bakasse M., Chtainia A. // J. Hazard. Mater. 2009. V. 163. P. 323–328.
18. El Mhammedi M.A., Bakasse M., Chtaini A. // Electroanalysis. 2007. V. 19. № 16. P. 1727–1733.
19. Кузнецова Т.А., Бесчастный А.П., Понаморев О.Н., Троценко Ю.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 6. С. 606–611.
20. Anthony C., Williams P. // Biochim. Biophys. Acta. 2003. V. 1647. P. 18–23.
21. Kurganov B.I., Lobanov A.V., Borisov I.A., Reshetilov A.N. // Anal. Chim. Acta. 2001. V. 427. № 1. P. 11–19.
22. de Garcia M.C., Manzano T., Duarte R., Alonso A. // Anal. Chim. Acta. 1995. V. 309. № 1–3. P. 241–250.
23. Алферов В.А., Зайцев М.Г., Понаморев О.Н., Кузнецова Т.А., Рогова Т.В., Решетилов А.Н. // Журн. аналит. химии. 2011. Т. 66. № 12. С. 1322–1329.
24. Gülce H., Gülce A., Kavanoz M., Coşkun H., Yıldız A. // Biosens. Bioelectron. 2002. V. 17. № 6–7. P. 517–521.

Properties of Modified Amperometric Biosensors Based on Methanol Dehydrogenase and *Methylobacterium nodulans* Cells

T. A. Kuznetsova^a, A. P. Beschastnyi^b, S. V. Alferov^a, and Yu. A. Trotsenko^b

^a Tula State University, Tula, 300600 Russia

e-mail: trotsenko@ibpm.pushchino.ru

^b Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

Received April 26, 2013

Abstract—The properties of amperometric biosensors based on methanol dehydrogenase (MDH), *Methylobacterium nodulans* cells, and the ferrocene-modified carbon paste electrode were investigated. It was shown that the addition of hydroxyapatite (HA) to a carbon paste increased the sensitivity and operating stability of MDH biosensors. The linear range of the electrode was 0.0135–0.5 and 0.032–1.5 mM for methanol and formaldehyde, respectively. The detection limit of methanol and formaldehyde was 4.5 and 11.0 μM, respectively. The loss of activity of the electrode within 10 days of storage in the presence of 2.0 mM KCN did not exceed 12%. Cyanide (10 mM) completely inhibited the sensor responses to formaldehyde (1.0 mM), which allowed for the selective determination of methanol in the presence of formaldehyde. The biosensor based on cells exhibited lower stability and sensitivity toward methanol and formaldehyde; the sensitivity coefficients were 980 and 21 nA/mM, respectively.