

ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТА МЕТАНОЛДЕГИДРОГЕНАЗЫ МЕТИЛОБАКТЕРИЙ В БИОЭЛЕКТРОКАТАЛИЗЕ

Т.А. Карасева

Тульский государственный университет, Тула, Россия

Метанолдегидрогеназа (МДГ) является основным ферментом первичного C_1 -метаболизма метиловых бактерий. Этот фермент катализирует окисление метанола до формальдегида, передавая электроны *in vivo* природному акцептору электронов – цитохрому c_L . Известно, что *in vitro* в присутствии феназинметосульфата (ФМС) или феназинэтосульфата МДГ способна проявлять активность с искусственными акцепторами электронов, получающими электроны от восстановленного фермента, такими как: 2,6 – дихлорфенолиндифенол (ДХФИФ), 1,6 – дихлорфенолиндифенол, голубой Вюрстера и др. [1]. Для характеристики свойств и описания кинетических параметров МДГ *in vitro* классическим является спектрофотометрический метод, описанный Энтони и Затманом, где в качестве красителей используют систему акцепторов электронов ДХФИФ и ФМС [2]. Эти данные являются основополагающими для применения МДГ в биоэлектрокатализе в качестве основы электрохимических биосенсоров и биотопливных элементов (БТЭ). Так, на основе МДГ *Methylobacterium extorquens* разработан биотопливный элемент для определения концентрации первичных спиртов. Наилучшие результаты были получены при использовании в качестве акцептора электронов N, N, N', N'-тетраметил-4-полифенилдиамин [3]. В другой работе иммобилизованную на поверхности угольно – пастового электрода МДГ *Methylobacterium extorquens* AM1 применяли для амперометрической детекции аммония в присутствии. Электрод многократно использовали при комнатной температуре в течение 15 дней, и он сохранил 50 % своей исходной активности ФМС [4]. В похожем исследовании фермент иммобилизовали на поверхности стеклоуглеродного электрода для амперометрической детекции метанола. Показано, что эффективными медиаторами могут служить N, N-диметил-п-фенилендиамин, N, N, N', N'-тетраметил-4-полифенилдиамин и ферроцена. Однако только в присутствии последнего сенсор давал стабильный ответ на метанол [5]. В работе [6] МДГ *Methylobacterium nodulans* иммобилизовали на поверхности графито-пастового электрода для определения концентрации метанола амперометрическим методом в присутствии медиатора электронного транспорта – ферроцена. Показано, что внесение гидроксиапатита в графитовую пасту повышало чувствительность и операционную стабильность МДГ-биосенсора. Электрохимическое окисление метанола и формальдегида под действием Eu^{3+} -МДГ метанотрофа *Methylophilum fumariolicum* SolV, с собственным цитохромным акцептором электронов c_{GL} , изучали в работе [7]. Фермент был соадсорбирован биополимером хитозана на электрод, модифицированный монослоем меркаптоундеканола. Изучение электрохимии, показало аналогичные биокаталитические свойства фермента, что и полученные в присутствии искусственной медиаторной пары ФМС/ДХФИФ. Вышеописанные примеры свидетельствуют о перспективности применения МДГ в качестве биокатализатора в биосенсорах и БТЭ в присутствии различных медиаторов электронного транспорта, причем как искусственных, так и природных. Следует отметить, что в описанных работах использовали только нативные МДГ.

Для получения нативной МДГ обычно используют хроматографические методы, включающие, как правило, от 2-х до 5 последовательных стадий, что снижает выход белка и увеличивает временные затраты на его получение. В большинстве известных работ [8–12] очистка фермента состоит из 2–3 хроматографических стадий с выходом от 17 до 29 %. Исключение составляет работа [13], в которой описана одностадийная очистка фермента посредством катионообменной хроматографии с последующей ультрафильтрацией, что способствует значительному увеличению выхода продукта до 67 %. Таким образом, для увеличения выхода и уменьшения длительности получения искомого фермента следует применять меньшее количество стадий при его очистке. Это возможно в случае применения метода одностадийной очистки рекомбинантной МДГ с помощью Ni^{2+} -NTA хроматографии.

В данной работе предлагается использование рекомбинантного штамма метиловых бактерий, сконструированного на основе дикого штамма *Methylobacterium extorquens* AM1, для одностадийной очистки МДГ и ее последующего применения в качестве основы амперометрического медиаторного биосенсора.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта государственного задания МИНОБРНАУКИ (FEWG-2020–0008 «Направленное формирование нано/био интерфейсов с переносом заряда в биоэлектрoхимических системах»).

Литература

1. Understanding the chemistry of the artificial electron acceptors PES, PMS, DCPIP and Wurster's Blue in methanol dehydrogenase assays / B. Jahn, N.S.W. Jonasson, H. Hu [et al] // J Biol Inorg Chem. 2020. V. 25. № 2. P. 199–212.
2. Anthony C., Zatman L.J. The microbial oxidation of methanol // Biochem. J. 1964. V.92. P.614–621.
3. Bioelectrochemical fuel cell and sensor based on a quinoprotein, alcohol dehydrogenase / G. Davis, [et al] // Enzyme Microb. Technol. 1983. V. 5. P. 383–388.
4. Mediated amperometric determination of ammonia with a methanol dehydrogenase from *Pseudomonas* sp. AM 1 immobilized carbon paste electrode / S. Suye [et al] // Biosens. Bioelectron. 1996. V. 5. P. 529–534.
5. Liu, Q.F., Kirchhoff J.R. Amperometric detection of methanol with a methanol dehydrogenase modified electrode sensor // Journal of Electroanalytical Chemistry. 2007. V. 601(1–2). P. 125–131.
6. Свойства модифицированных амперометрических биосенсоров на основе метанолдегидрогеназы и клеток *Methylobacterium nodulans* / Кузнецова Т.А., Бесчастный А.П., Алферов С.В. [и др.] // Прикл. биохим. микробиол. 2013. Т. 49. № 6. С. 613–618.
7. Electrocatalysis of a Europium-Dependent Bacterial Methanol Dehydrogenase with Its Physiological Electron-Acceptor Cytochrome cGJ / P. Kalimuthu [et al] // Chemistry. 2019. V. 25(37). P. 8760–8768.
8. Purification and properties of methanol dehydrogenase from *Methylosinus* sp. WI 14 / S. Grosse [et al] // J. Basic Microbiol. 1998. V. 38. № 3. P. 189–196.
9. Purification and properties of methanol dehydrogenase from *Methylocystis* sp. GB 25 / S. Grosse [et al] // J. Basic Microbiol. 1997. P. 269–279.
10. Kim, H.G., Kim S.W. Purification and characterization of a methanol dehydrogenase derived from *Methylomicrobium* sp. HG 1 cultivated using a compulsory circulation diffusion system // Biotechnology and bioprocess engineering. 2006. V.11. P. 134–139.
11. Очистка и свойства метанолдегидрогеназы ризосферного фитосимбионта *Methylobacterium nodulans* / Т.А. Кузнецова [и др.] // Прикл. биохим. микробиол. 2012. Т. 48. № 6. С. 606–611.
12. Kim, H.G., et al., Comparative analysis of two types of methanol dehydrogenase from *Methylophaga aminisulfidivorans* MPT grown on methanol. J Basic Microbiol, 2012. 52(2): p. 141–9.
13. A rapid method for the purification of methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* / Q. Liu [et al] // Protein Expr Purif. 2006. V. 46(2). P. 316–20.