

УДК 579.22

## ОЧИСТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТАНОЛДЕГИДРОГЕНАЗЫ РИЗОСФЕРНОГО ФИТОСИМБИОНТА *Methylobacterium nodulans*

© 2012 г. Т. А. Кузнецова\*\*, А. П. Бесчастный\*, О. Н. Понаморёва\*\*, 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 05.05.2012 г.

Метанолдегидрогеназа (МДГ) факультативно-метилотрофного ризосферного фитосимбионта *Methylobacterium nodulans* впервые очищена до электрофоретически гомогенного состояния и охарактеризована. Молекулярная масса нативного белка ~70 кДа и состоит из большой (60 кДа) и малой (6 кДа) субъединиц. Очищенный белок имел спектр идентичный с пирролохинолинхинон (ПХХ) – содержащими МДГ, рI – 8.7, рН-оптимум в пределах 9–10. Фермент неактивен в отсутствие аммония или метиламина, проявлял широкую субстратную специфичность по отношению к C<sub>1</sub>–C<sub>5</sub> спиртам, наибольшее сродство к метанолу (K<sub>M</sub> = 70 мкМ), но не окислял бензиловый и вторичные спирты. Кажущиеся значения K<sub>M</sub> к первичным спиртам возрастали с длиной углеродной цепи. Фермент характеризовался высокой стабильностью даже в отсутствие субстрата. Иммуобилизованный фермент был использован для амперометрической детекции метанола.

*Methylobacterium nodulans* – факультативный метилотроф, выделенный из корневых клубеньков трех видов бобовых рода *Crotalaria*: *C. podocarpa*, *C. glaucoides* и *C. perrottetii*, обладает способностью к азотфиксации и нодуляции в процессе симбиоза с представителями рода *Crotalaria*. Показано, что *M. nodulans* растет на метаноле в качестве источника углерода и энергии, имеет ген *mxaF*, кодирующий большую субъединицу МДГ, идентичную на 88% МДГ *M. extorquens* и *M. organophilum* [1]. Инактивация этого гена инсерционным мутагенезом приводила к неспособности *M. nodulans* расти на метаноле и негативно отражалась на развитии *C. podocarpa* при симбиозе с таким мутантом [2, 3]. Секвенирование генома *M. nodulans* (Refseq/GenBank NC\_011894/CP001349) выявило присутствие нескольких гомологичных *mxaF* генов, а в экстрактах, выросших на метаноле клеток *M. nodulans*, были обнаружены активности ферментов первичного метаболизма метанола и, в частности, активируемая аммонием МДГ [4]. Однако фермент не был очищен и охарактеризован.

Как известно, МДГ (КФ 1.1.2.7) грамотрицательных метиловых бактерий – периплазматический растворимый белок. Наиболее эффективно фермент катализирует окисление метанола до формальдегида (K<sub>M</sub> ~ 20 мкМ), передавая электроны в клетках на специфический кислый цитохром c<sub>1</sub>. Кроме метанола, МДГ окисляет первичные спирты и альдегиды, используя искусственные акцепторы электронов, такие как феназинметосульфат (ФМС) и феназинэтосульфат (ФЭС). Рентгено-

структурный анализ показал, что белок является гетеротетрамером (α<sub>2</sub>β<sub>2</sub>). В больших α-субъединицах, кодируемых геном *mxaF*, находится активный центр с нековалентно связанной простетической группой – пирролохинолинхиноном (ПХХ) и Ca<sup>2+</sup>. Функции малой β-субъединицы, кодируемой геном *mxaI*, не ясны [5–7]. Несмотря на то, что МДГ исследована у многих бактерий [8–14], в последние годы повысился интерес к изучению новых форм этого фермента и свойств у разных видов метилотрофов из необычных мест обитания [15–17]. Это обусловлено как ключевой ролью в метаболизме C<sub>1</sub>-соединений, так и перспективами использования фермента в биокатализе. Окислительно-восстановительные свойства, независимость от кислорода и специфичность МДГ являются основой для создания высокочувствительных биосенсоров и эффективных биотопливных элементов [18, 19].

Цель работы – очистка и характеристика основных свойств МДГ из ризосферного фитосимбионта *M. nodulans* для последующего использования в амперометрическом биосенсоре.

### МЕТОДИКА

**Объект и условия культивирования.** *M. nodulans* ORS2060T (CNCM I 2342T = LMG 21967T), полученный от С.Дж. Маркса (Гарвардский университет, США), выращивали, как описано ранее, с 0.5% (по объему) метанола в качестве единственного источника углерода и энергии [4]. Клетки в

конце экспоненциальной фазы роста (3 сут) осаждали при 10000 g 20 мин на центрифуге Beckman J2-21 (США). Биомассу промывали 50 мМ трис-НСl буфером, рН 7.5, и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Энзимологические исследования.** Активность МДГ определяли спектрофотометрически при 600 нм ( $\epsilon = 1.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) при  $30^{\circ}\text{C}$  по методу [20] с незначительной модификацией реакционной смеси. Стандартная реакционная смесь содержала: 100 мМ трис-НСl, рН 9.0, 15 мМ  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 2 мМ КСN, 10 мМ  $\text{CH}_3\text{OH}$ , 87 мкМ 2.6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ), 1.1 мМ ФМС. Реакцию начинали внесением фермента, измеряя начальную скорость в пределах 15–30 с. За единицу активности принимали количество МДГ, которое катализирует восстановление 1 мкмоль ДХФИФ за 1 мин. Если не указано особо, кинетические константы рассчитывали методом нелинейной регрессии с аппроксимацией экспериментальных данных к уравнению Михаэлиса–Ментен, используя программу “SigmaPlot 8.0”.

Электрофорез проводили в градиенте (10–20%) ПААГ в присутствии ДДС-Na по методу Лэмли. Гели окрашивали Кумасси R250 “Serva” (Германия). Для калибровки гелей использовали набор стандартных белков S8445 “Sigma–Aldrich” (США). Молекулярную массу нативного белка определяли гель-фильтрацией на колонке Bio-Sil TSK 250 “Bio-Rad Laboratories Inc.” (США), откалиброванной с помощью стандартных белков MWGF200 S8445 “Sigma–Aldrich” (США). Элюирующий буфер – 0.1 М калий фосфатный буфер (КФБ), рН 7.0. Скорость – 0.5 мл/мин. Белок определяли методом Брэдфорд, в качестве стандарта использовали БСА.

Изоэлектрофокусирование проводили в ПААГ, используя амфолины рН 3.5–10 “LKB” (Швеция) по рекомендациям фирмы. Для калибровки геля использовали набор стандартных белков 17-0471-01 “GE Healthcare” (Швеция).

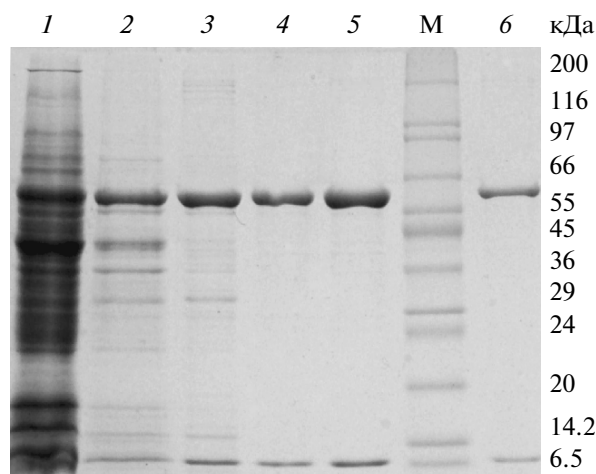
**Очистка МДГ.** Клетки (20 г) ресуспендировали в 80 мл 0.1 М трис-НСl буфере (рН 7.5), содержащем 0.2 мг/мл лизоцима и 1 мМ ЭДТА и дезинтегрировали на установке “MSE” (Англия) при 150 Вт и 20 кГц и  $4^{\circ}\text{C}$  (30 с  $\times$  16 с интервалами по 30 с). Полученный гомогенат центрифугировали при 15000 g 30 мин на “J2-21 “Beckman” (США). Все стадии очистки проводили при  $4^{\circ}\text{C}$ . Экстракт высаливали сульфатом аммония, получая фракцию от 40 до 60% от его насыщения. Осадок растворяли в 10 мМ трис-НСl буфере, рН 8.0, и обессоливали на колонке (1.6  $\times$  12 см) с сефадексом G-25, уравновешенной тем же буфером. Для удаления балластных белков и нуклеиновых кислот препарат пропускали со скоростью 0.8 мл/мин через колонку (16  $\times$  120 мм) с DEAE-Sepharose FF “GE Healthcare” (Швеция), уравновешенную тем же буфером. В этих условиях МДГ на колонке не

сорбировалась и препарат сразу наносили (0.5 мл/мин) на колонку (16  $\times$  50 мм) с гидроксипатитом HA-Ultrogel “LKB” (Швеция), используя тот же буфер. Колонку промывали тремя объемами 0.2 М NaCl в 25 мМ КФБ, рН 7.0, и элюировали МДГ градиентом 0.025–0.25 М КФБ с рН 7.0 (120 мл). Активные фракции объединяли, концентрировали на ультрафильтрационной мембране YM10 (“Amicon”). Обессоливание и замену буфера проводили, разбавляя образец в 20 раз 20 мМ 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислотой – NaOH (МЭС-NaOH) рН 5.5, и повторяли ультрафильтрацию трижды. В заключение проводили катионно-обменную ВЭЖХ на хроматографе LC-20 Prominence “Shimadzu” (Япония). Далее образец наносили на колонку (8  $\times$  75 мм) Protein Pak Glass SP-5PW “Waters” (США), уравновешенную 20 мМ буфером МЭС-NaOH, рН 5.5. После промывки колонки исходным буфером (15 мл) МДГ элюировали линейным градиентом 0–0.25 М NaCl (60 мл) при скорости 1 мл/мин. Активные фракции объединяли, затем концентрировали и переводили в 20 мМ КФБ, рН 7.0, ультрафильтрацией, как указано выше. Препарат хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

**Электрохимические измерения.** Формирование рабочего электрода и электрохимические измерения проводили по описанной методике [21]. Электрод заполняли графитовой пастой, содержащей 10% ферроцена и 30% гидроксипатита (по массе). Фермент (0.26 ед.) наносили на поверхность электрода, подсушивали 30 мин. Буфер для измерений – 50 мМ КФБ, рН 8.0, с добавлением 15 мМ  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Электрод хранили при  $4^{\circ}\text{C}$  в 50 мМ КФБ, рН 7.0, содержащем 2.0 мМ КСN.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Одностадийная очистка МДГ *M. nodulans* катионообменной хроматографией не привела к получению гомогенного препарата, как было показано для фермента из *Methylobacterium extorquens* AM1 [13]. Проведение хроматографии анионно-обменной и на гидроксипатите перед катионообменной также не приводило к получению гомогенного препарата, поэтому бесклеточный экстракт предварительно фракционировали сульфатом аммония благодаря чему, несмотря на потери, достигалась очистка в 6 раз. Так как фракции, полученные при насыщении сульфата аммония менее 40% и выше 60% содержали в совокупности не более 10% от суммарной активности МДГ, потери, по-видимому, были вызваны денатурацией белка. Использование разработанной схемы очистки позволило получить электрофоретически гомогенный препарат фермента (рис. 1). Результаты очистки МДГ представлены в табл. 1. После заключительной хроматографии на катионообменнике и концентрирования фермент был очищен в 18.2 раза с удельной активностью 3.8 ед./мг белка.



**Рис. 1.** ПААГ-электрофорез МДГ на разных стадиях очистки. 1 – гомогенат, 2 – 40–60%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 3 – ДЭАЭ-сефароза, 4 – HA-Ultrogel и ультрафильтрация, 5, 6 – SP-5PW, М – маркеры.

Из этого следовало, что содержание МДГ в клетках *M. nodulans* составляло около 5% от общего растворимого белка, тогда как у других метиловых бактерий >10% [5]. Возможно, это связано с синтезом *M. nodulans* белков, необходимых для фитосимбиоза.

ДДС-ПААГ-электрофорез очищенного белка выявил присутствие большой и малой субъединиц с молекулярными массами около 60.5 кДа и 6.5 кДа соответственно (рис. 1). Значения, рассчитанные на основании транслированных нуклеотидных последовательностей генов *mxaF* (Mnod\_8040) большой (62548 Да) и малой *mxaI* (Mnod\_8037) субъединиц (5838 Да) за вычетом сигнальных пептидов незначительно отличались от полученных данных. Молекулярная масса нативного белка, определенная методом гель-фильтрации в 0.1 М КФБ, рН 7.0, составляла около 70 кДа, что соответствовало гетеродимеру ( $\alpha\beta$ ), состоящему из большой и малой субъединиц. Причем белковый пик на хроматограмме соответствовал пику активности МДГ. Увеличение ион-

ной силы буфера не отражалось на положении пика. Ранее аналогичным методом было показано существование мономерной формы МДГ у некоторых метилотрофов, по-видимому, из-за трудности детектирования  $\beta$ -субъединицы [22], хотя для большинства позднее доказана  $\alpha_2\beta_2$  структура [5–7]. Изоэлектрическая точка находилась около рН 8.7, как и у большинства ранее изученных МДГ грамотрицательных бактерий [9, 11, 13].

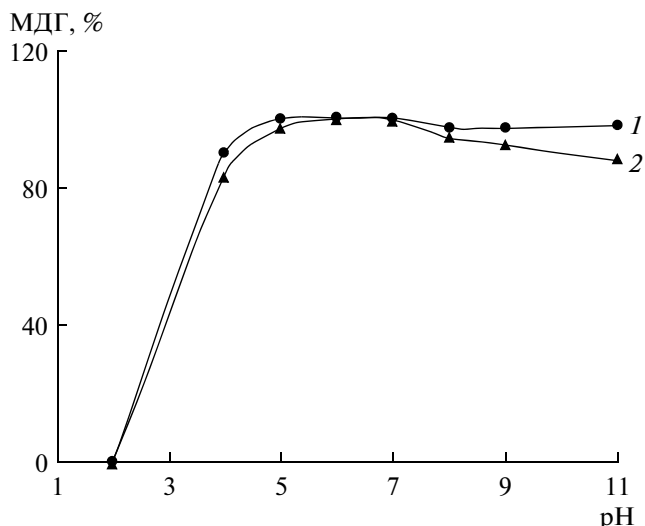
В спектре поглощения МДГ *M. nodulans* наблюдали максимум при 350 нм и широкое плечо абсорбции до 410 нм. Такой спектр идентичен спектрам ПХХ-зависимых МДГ метилотрофных бактерий и свидетельствует о присутствии в белке восстановленной формы ПХХ. Именно в таком виде находится данная простетическая группа в чистых препаратах изученных ранее МДГ [23, 24].

Фермент *M. nodulans* характеризовался высокой стабильностью при хранении в отсутствие метанола относительно других белков. Очищенный препарат в 20 мМ КФБ (рН 7.0) при 4°C терял приблизительно 20% активности в течение недели и 40% при –20°C в течение месяца. При –70°C активность не изменялась в течение двух месяцев. В отличие от большинства МДГ фермент *M. nodulans* обладал стабильностью в широком диапазоне рН даже в отсутствие стабилизаторов, таких, как цианид и метанол (рис. 2). Подобной стабильностью обладал также фермент *Methylobacterium extorquens* [13]. МДГ *M. nodulans* в 0.1 М КФБ, рН 6.0, при концентрации белка 0.4 мг/мл сохраняла активность в течение 20 мин при 50°C, тогда как при 60°C потеря составляла 35%.

Зависимость активности МДГ от рН определяли в стандартной инкубационной смеси с различными 0.1 М буферами с рН от 6 до 10 (рис. 3). Максимальную активность фермент проявлял в диапазоне рН 9.0–10.0. Выше рН 10 активность не удалось измерить из-за неустойчивости ФМС и ДХФИФ. Оптимум рН- в щелочной области при 9 и выше характерен для всех исследованных МДГ в системе с искусственными акцепторами электронов, такими как ФМС [5–7].

**Таблица 1.** Очистка МДГ из *M. nodulans*

Стадия очистки	Удельная активность, ед./мг	Белок, мг/мл	Общая активность, ед.	Общий белок, мг	Выход, %	Степень очистки, раз
Экстракт	0.21	11.1	227.0	1080	100	1
40–60% насыщения сульфатом аммония	1.23	23.3	107.3	87.4	47	5.9
ДЭАЭ-сефароза	2.53	1.0	77.2	30.5	34	12.1
HA-Ultrogel	3.68	0.34	72.4	19.7	32	17.6
Ультрафильтрация	3.78	0.75	62.5	14.3	28	18
SP-5PW	3.82	1.38	52.7	13.8	23	18.2

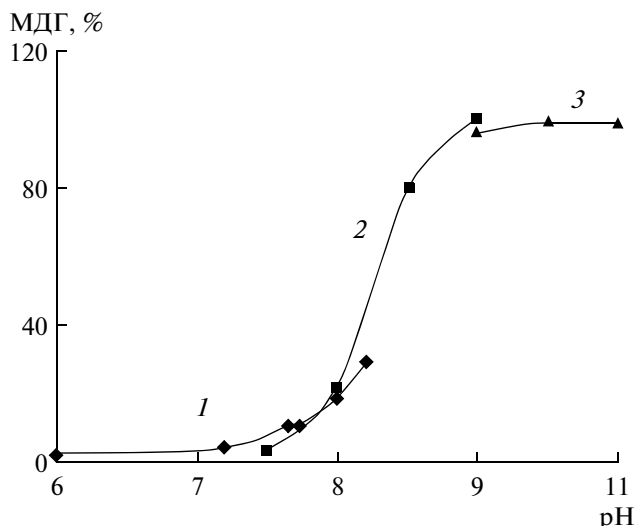


**Рис. 2.** Стабильность препарата МДГ (70 мкг/мл) при различных значениях рН и 30°С в течение 40 мин (1), 80 мин (2) в 0.1 М буферах: рН 2 – цитрат-NaOH; рН 4–5 – ацетат-NaOH; рН 6–7 –  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ ; рН 8–9 – трис-HCl; рН 11 –  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaOH}$ .

Активность МДГ в 0.1 М трис-HCl буфере, рН 9.0, в стандартной реакционной смеси линейно возрастала с увеличением температуры от 20 до 50°С. При более высоких температурах получить достоверные значения активности не удалось из-за неферментативных реакций ФМС и ДХФИФ.

Аналогично другим ПХХ-МДГ [5–7], активность *M. nodulans* с искусственными акцепторами электронов *in vitro* зависела от присутствия активатора –  $\text{NH}_4^+$ . В отсутствие  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , с метанолом и с эндогенным субстратом реакций не наблюдалось. Половина максимальной скорости достигалась при его концентрации  $1.2 \pm 0.3$  мМ, когда акцептором являлся ФМС. Кроме аммония, стимулирующим действием на фермент *M. nodulans*, обладал метиламин, но при концентрации 40 мМ в реакционной смеси активность составляла только 26% от активности с 15 мМ  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Гидрохлориды диметиламина, триметиламина и этиламина не являлись активаторами МДГ *M. nodulans*.

Одной наиболее известной особенностью чистых препаратов ПХХ-МДГ является способность восстанавливать ФМС или ФЭС без метанола за счет не идентифицированного эндогенного субстрата [20]. Фермент *M. nodulans* с эндогенным субстратом проявлял активность при насыщающей концентрации метанола, делая невозможным непосредственное определение кинетических констант. Цианид ингибирует эту реакцию, являясь конкурентным ингибитором фермента при использовании в качестве субстрата метанола [23]. Используя метод Диксона, были рассчитаны кажущаяся ве-

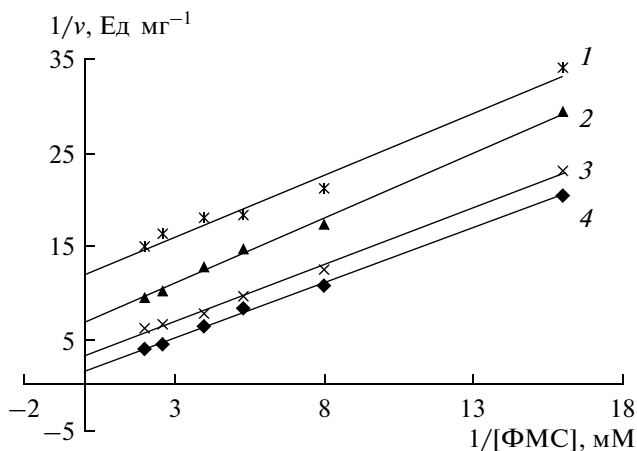


**Рис. 3.** Активность МДГ в зависимости от рН реакционной смеси. 1 –  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ ; 2 – трис-HCl; 3 – глицин-NaOH. Все буферы 0.1 М.

личина  $K_M$  в отсутствие KCN – 70 мкМ и константа ингибирования  $K_i$  – 0.65 мМ.

Зависимости обратных значений начальных скоростей МДГ *M. nodulans* от обратных концентраций метанола при фиксированных концентрациях ФМС в присутствии 2 мМ KCN (рис. 4) представляли серию параллельных прямых, характерных для Ping-Pong механизма, что согласуется с данными литературы [5–7].

Кинетические константы, рассчитанные по методу Дальзиела в соответствии с уравнением:  $\frac{E}{v} = \phi_0 + \frac{\phi_A}{[A]} + \frac{\phi_B}{[B]}$ , составляли:  $K_{M[\text{CH}_3\text{OH}]}$  = 0.37 мМ;



**Рис. 4.** Зависимость начальной скорости МДГ от концентрации ФМС при фиксированных концентрациях метанола (мМ): 1 – 0.025; 2 – 0.05; 3 – 0.08; 4 – 0.5.

**Таблица 2.** Субстратная специфичность МДГ *M. nodulans*

Субстрат	Кажущиеся $K_M$ , мМ	Активность, %
Метанол	$0.23 \pm 0.01$	100
Этанол	$0.61 \pm 0.06$	93
Бутанол-1	$1.9 \pm 0.2$	88
Амиловый спирт	$1.4 \pm 0.1$	89
Формальдегид	$7.2 \pm 0.8$	96
Ацетальдегид	$14.9 \pm 0.6$	50
ФМС*	$0.91 \pm 0.02$	100
ФЭС*	$1.52 \pm 0.11$	80

\* Субстрат – 10 мМ метанол.

**Таблица 3.** Влияние различных соединений на активность МДГ

Вещество	Концентрация, мМ	Активность, %
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.1	71
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	53
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1	88
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.1	0
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1	96
$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1	102
$\text{NaN}_3$	1	99
$\text{NaCl}$	500	90
п-Хлормеркурибензоат	0.1	74
Этилендиаминтетраацетат	1	110
$\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$	0.1	88
Дитиотреитол	0.1	100
2-Оксоглутарат	1	77
D-Трегалоза	5%	82
D-Сорбит	5%	67
Полиэтиленимин	0.1%	115
Поливинилпирролидон	0.5%	61
ДСН	0.1%	47
Бридж 35	0.1%	73

$K_M[\text{ФМС}] = 0.96 \text{ мМ}$ ;  $V_{\text{макс}} = 7.1 \text{ мкмоль/мг белка}$ . Аналогичные значения  $K_M$  к донору и акцептору электронов в присутствии 1 мМ KCN были получены для МДГ *Hyphomicrobium X* [25].

Подобно другим МДГ [5–7], исследуемый фермент проявлял широкую субстратную специфичность относительно первичных спиртов, но не окислял вторичные и бензиловый спирт (табл. 2). Фермент обладал наибольшим сродством к метанолу. В целом, с увеличением длины углеродной цепи первичных спиртов возрастало кажущееся значение  $K_M$  фермента, тогда как максимальная скорость реакции изменялась незначительно.

Субстратами являлись также формальдегид и ацетальдегид, которые при высоких концентрациях ингибировали МДГ. ФМС оказался более эффективным акцептором электронов, чем ФЭС, что было показано для МДГ *Hyphomicrobium X* [23].

Действие различных соединений на активность фермента *M. nodulans in vitro* (табл. 3) было аналогично изученным МДГ [8, 11, 14]. Фермент также нечувствителен к ЭДТА и относительно устойчив к сульфгидрильному реагенту, п-хлормеркурибензоату. Катионы меди, железа и особенно марганца – сильные ингибиторы описанных МДГ [11, 13], за исключением МДГ *Methylosinus* sp. WI 14 [12]. На активность фермента негативно влияли детергенты, поливинилпирролидон и сорбит. Вместе с тем белок устойчив к NaCl, ДТТ,  $\text{NaN}_3$ , D-трегалозе и полиэтиленимину. Гидроксиламин – конкурентный ингибитор по отношению к метанолу для МДГ *Hyphomicrobium X* [25], незначительно подавлял активность изучаемого фермента.

Таким образом, высокая стабильность и сродство к метанолу делает МДГ *M. nodulans* одним из наиболее перспективных ферментов для создания амперометрического биосенсора. Очищенный препарат МДГ был иммобилизован на поверхность графитово-пастового электрода, содержащего медиатор электронного транспорта – ферроцен. Для улучшения адсорбции гидрофильного фермента на поверхности гидрофобного электрода в графитовую пасту добавляли гидроксипатит. При этом отклик биосенсора увеличивался в 10 раз и улучшалась операционная стабильность. Среднее значение для полученных откликов биосенсора на 0.25 мМ метанола для электрода, модифицированного гидроксипатитом, составило  $1400 \pm 100 \text{ нА}$ . Относительное стандартное отклонение для 15 последовательных измерений – 7.6%, тогда как без гидроксипатита относительное стандартное отклонение составило 83%. Линейный диапазон определяемых концентраций метанола 0.0135–0.5 мМ, предел обнаружения – 4.5 мкМ  $\text{CH}_3\text{OH}$ , длительность единичного измерения – 10 мин; при хранении электрода в течение 20 сут сохранялось 75% активности. Подбор оптимальных условий использования и хранения электрода, концентраций гидроксипатита, ферроцена и, возможно, более эффективных медиаторов электронного транспорта требует дополнительных исследований.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 11-04-97544-р\_центр\_a).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sy A., Giraud E., Jourand P., Garcia N., Willems A., de Lajudie P., Prin Y., Neyra M., Gillis M., Boivin-Masson C., Dreyfus B. // J. Bacteriol. 2001. V. 183. № 1. P. 214–220.

2. Jourand P., Renier A., Rapior S., Miana de Faria S., Prin Y., Galiana A., Giraud E., Dreyfus B. // *Mol. Plant-Microbe Interactions*. 2005. V. 18. № 10. P. 1061–1068.
3. Renier A., De Faria S.M., Jourand P., Giraud E., Dreyfus B., Rapior S., Prin Y. // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. № 10. P. 3693–3697.
4. Капарулина Е.Н., Быкова Т.В., Федоров Д.Н., Дорошина Н.В., Троценко Ю.А. // *Микробиология*. 2001. Т. 80. № 6. С. 847–849.
5. Anthony C. // *Adv. Microb. Physiol.* 1986. V. 27. P. 113–210.
6. Anthony C., Williams P. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2003. V. 1647. P. 18–23.
7. Anthony C. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2004. V. 428. № 1. P. 2–9.
8. Ghosh R., Quayle J.R. // *Biochem. J.* 1981. V. 199. № 1. P. 245–250.
9. Соколов А.П., Говорухина Н.И., Троценко Ю.А. // *Биохимия*. 1989. Т. 54. № 5. С. 811–815.
10. Duine J.A., Frank J., Westerling J. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1978. V. 524. № 2. P. 277–287.
11. Grosse S., Wendlandt K.D., Kleber H.P. // *J. Basic Microbiol.* 1997. V. 37. № 4. P. 269–279.
12. Grosse S., Voigt C., Wendlandt K.D., Kleber H.P. // *J. Basic Microbiol.* 1998. V. 38. № 3. P. 189–196.
13. Liu Q., Kirchhoff J.R., Faehnle C.R., Viola R.E., Hudson R.A. // *Protein Expr. Purif.* 2006. V. 46. № 2. P. 316–320.
14. Kim H.G., Kim S.W. // *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2006. V. 11. P. 134–139.
15. Chang A.K., Lim C.Y., Kim S.W., You H.J., Hahm K.S., Yoon S.M., Park J.K., Lee J.S. // *J. Basic Microbiol.* 2002. V. 42. № 2. P. 238–245.
16. Kalyuzhnaya M.G., Hristova K.R., Lidstrom M.E., Chistoserdova L. // *J. Bacteriol.* 2008. V. 190. № 11. P. 3817–3823.
17. Schmidt S., Christen P., Kiefer P., Vorholt J.A. // *Microbiology*. 2010. V. 156. P. 2575–2586.
18. Karube I., Yokoyama K., Kitagawa Y. *Principles and Applications of Quinoproteins* / Ed. V.L. Davidson. New York: Marcel Dekker, 1992. P. 429–446.
19. Ikeda T., Kano K. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2003. V. 1647. № 1–2. P. 121–126.
20. Day D.J., Anthony C. // *Methods Enzymol.* 1990. V. 188. P. 210–216.
21. Babkina E., Chigrinova E., Ponamoreva O., Alferov V., Reshetilov A. // *Electroanalysis*. 2006. V. 18. № 19–20. P. 2023–2029.
22. Duine J.A., Jongejan J.A. // *Annu. Rev. Biochem.* 1989. V. 58. P. 403–426.
23. Frank J., Duine J.A. // *Methods Enzymol.* 1990. V. 188. P. 202–209.
24. Richardson I.W., Anthony C. // *Biochem. J.* 1992. V. 287. P. 709–715.
25. Duine J.A., Frank J. // *Biochem. J.* 1980. V. 187. № 1. P. 213–219.

## Purification and Characteristics of Methanol Dehydrogenase of *Methylobacterium nodulans* Rhizosphere Phytosymbionts

T. A. Kuznetsova<sup>b</sup>, A. P. Beschastnyi<sup>a</sup>, O. N. Ponamoreva<sup>b</sup>, and Yu. A. Trotsenko<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, pr. Nauki 5, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

<sup>b</sup> *Tula State University, Tula, 300600 Russia*

*e-mail: trotsenko@ibpm.pushchino.ru*

Received May 5, 2012

**Abstract**—Methanol dehydrogenase (MDG) of the facultative methylotrophic phytosymbiont *Methylobacterium nodulans* has been purified for the first time to an electrophoretically homogeneous state and characterized. The native protein with a molecular mass of 70 kDa consists of large (60 kDa) and small (6 kDa) subunits. The purified protein displayed a specter identical to that of pyrocinolinchinon (PCC)-containing MDGs (pI 8.7, pH optimum in the range 9–10). The enzyme was inactive in the absence of ammonium or methylamine and exhibited a wide substrate specificity with regard to C<sub>1</sub>–C<sub>2</sub> alcohols with the highest affinity to methanol ( $K_M = 70$  mM), but it did not oxidize benzyl and secondary alcohols. The apparent values of  $K_M$  to primary alcohols increased with the length of the carbonic chain. The enzyme was characterized by a high stability level even in the absence of a substrate. An immobilized enzyme was used for amperometric methanol detection.