



Аэробные метилотрофы – перспективные объекты биотехнологии

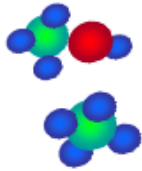
Ю.А. Троценко

Лаборатория метилотрофии

Институт Биохимии и Физиологии Микроорганизмов

им. Г.К. Скрыбина РАН

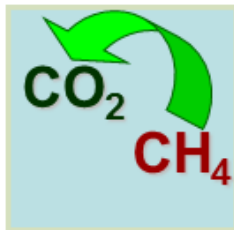
Пущино, Московская область



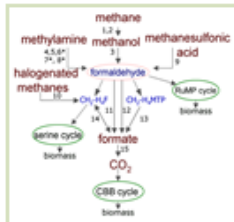
Метилотрофы – микроорганизмы, использующие метан и его окисленные или замещенные производные как источники углерода и энергии; основные участники глобального цикла C_1 -соединений.



Метилотрофия широко распространена в микробном мире, в частности, γ α -, β -, γ -*Proteobacteria* и *Verrucomicrobia*, реже – среди дрожжей.



Метанотрофы – высокоспециализированная группа бактерий, способных расти на метане, играют ключевую роль в регуляции атмосферной концентрации CH_4 .

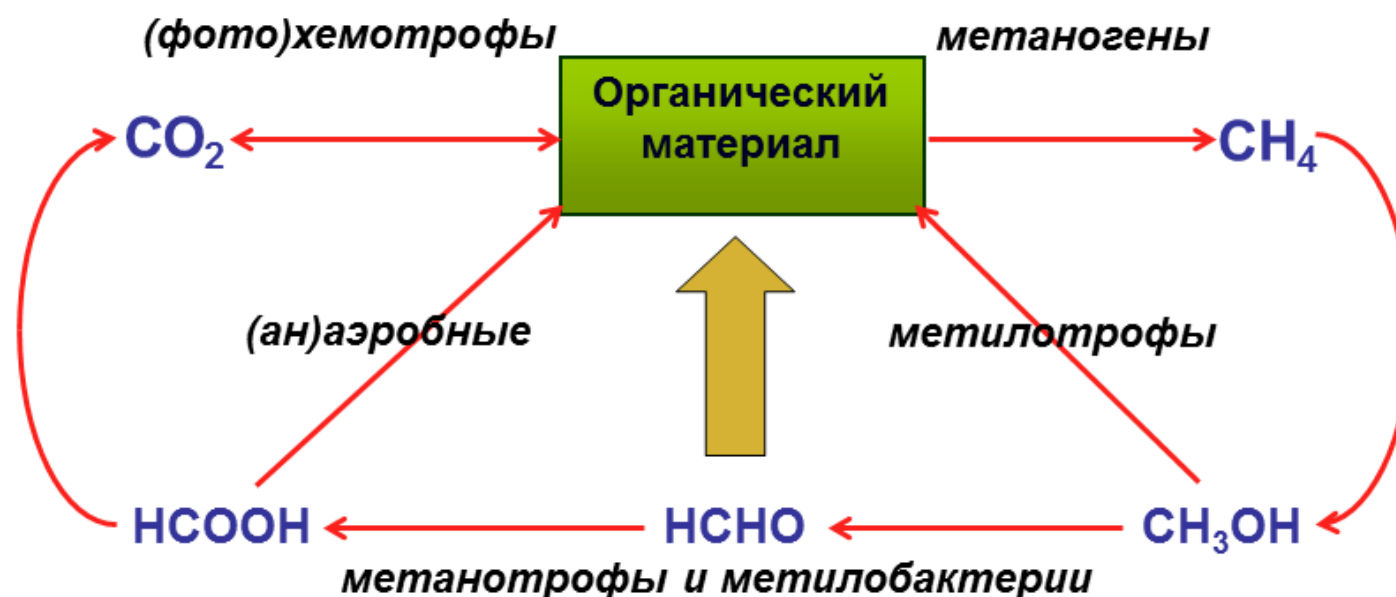


Метилотрофы реализуют уникальные пути C_1 -окисления (кофакторы - PQQ, GSH, НАД (Ф)+, ТГФ, ТГМП) и C_1 -ассимиляции: сериновый и пентозофосфатные с участием специфических генов (> 100) и ферментов (>20).



Коммерческий интерес к метилотрофам связан с их биосинтетическим, биоаналитическим и биоремедиационным потенциалом.

Ключевая роль аэробных метилотрофов в глобальных биосферных циклах углерода метана и метанола

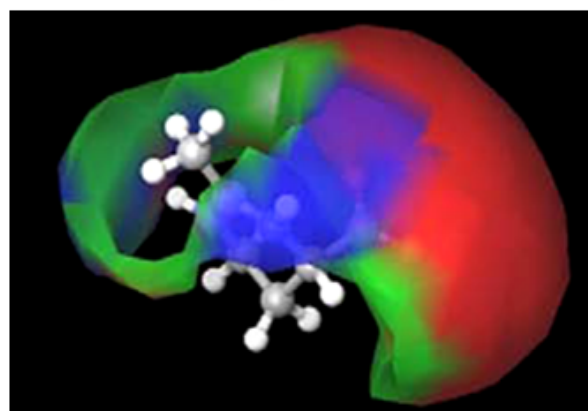
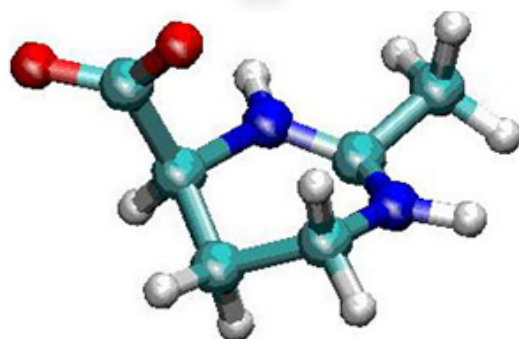
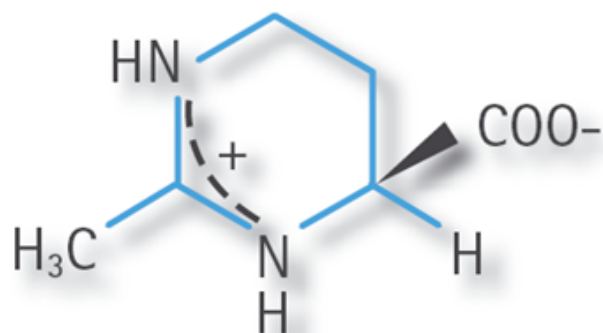


Трофические и метаболические связи анаэробных и аэробных агентов метанового цикла Зёнгена в глобальных биосферных циклах углерода (Гт С/г)

Парниковые газы:	СО ₂	~ 1500
	СН ₄	~ 800 (наибольший "парниковый" эффект)
	СН ₃ ОН	~ 300

Аэробные метилотрофы как агенты биосинтеза

- **Продукция белка одноклеточных (Single Cell Protein, SCP):**
Прутин (Англия), Провестин (США), Пробион (ФРГ),
Бипротеин (Норвегия), Гаприн и Меприн (Россия)
- **Биосинтез алифатических и ароматических аминокислот:**
серин, метионин, триптофан, тирозин, фенилаланин, эктоины
- **Биосинтез биополимеров:**
полигидроксибутират/валерат (ПГБ/В),
экзополисахариды (ЭПС),
пигменты (каротиноиды, меланины, пиовердин)
цитохромы
- **Биосинтез витаминов и коферментов:**
Рибофлавин (В₂), цианкобаламин (В₁₂),
Флавиномоно- и динуклеотиды (ФМН/ФАД),
Пирролохинолинхинон (ПХХ, PQQ)
Триптофантриптофилхинон (ТТХ, TTQ)
- **Трансформация алканов, алкенов и их замещенных производных в соответствующие оксиды**



Молекулярная структура и гидрофильная оболочка эктоина

Эктоин

1,4,5,6-тетрагидро-2-метил-4-пиримидин карбоксилловая кислота

Сферы применения

Молекулярная биология:

термостабилизатор ферментов, нуклеиновых кислот, ДНК-белковых комплексов и целых клеток

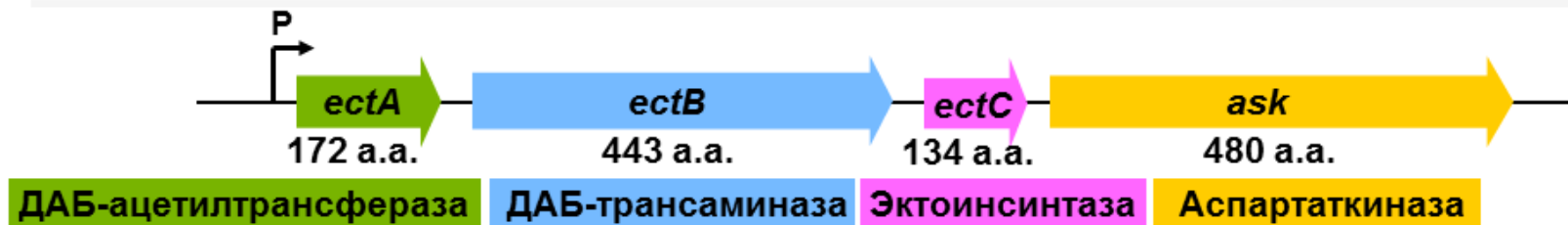
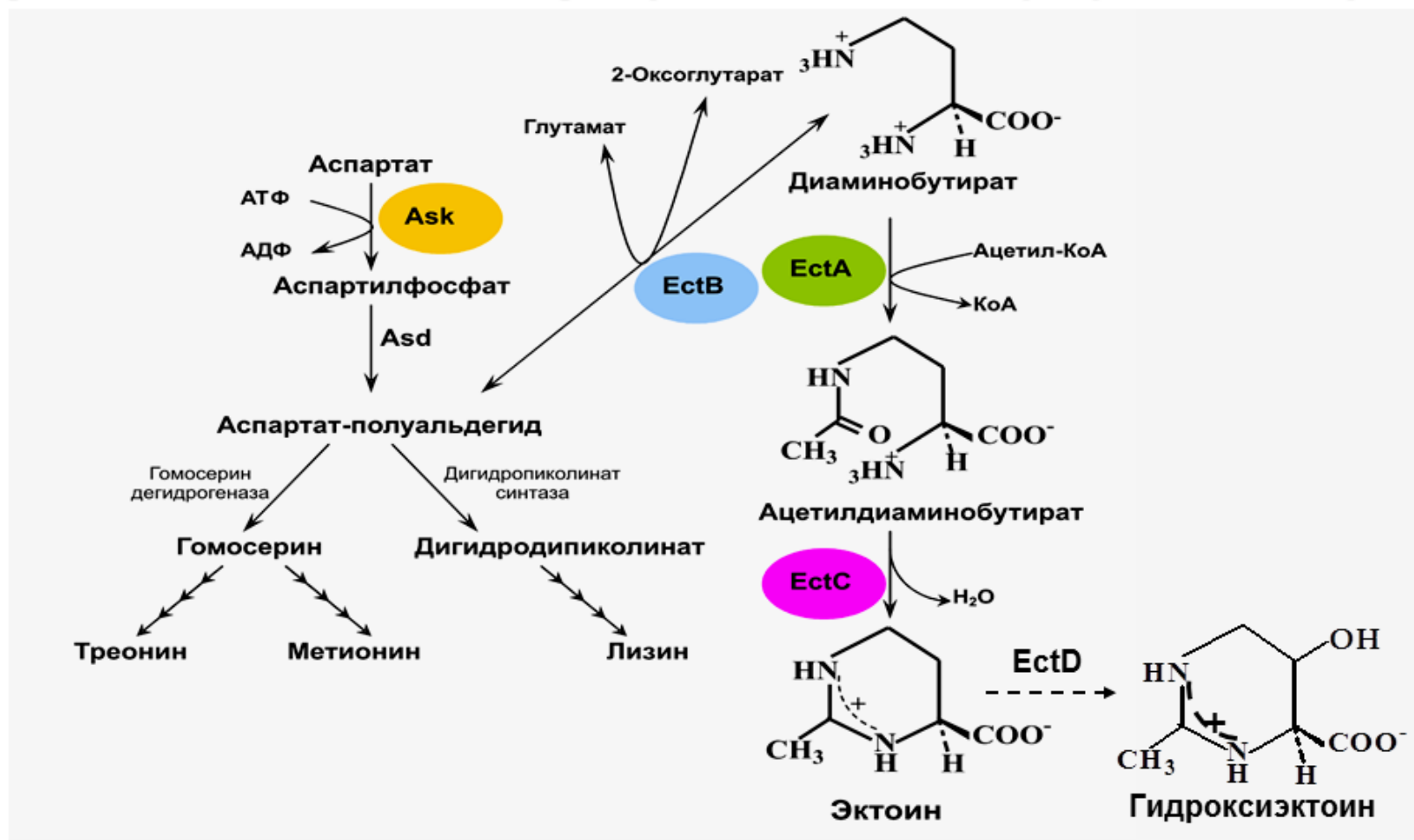
Медицина:

биопротектор клеток при радио- и химиотерапии

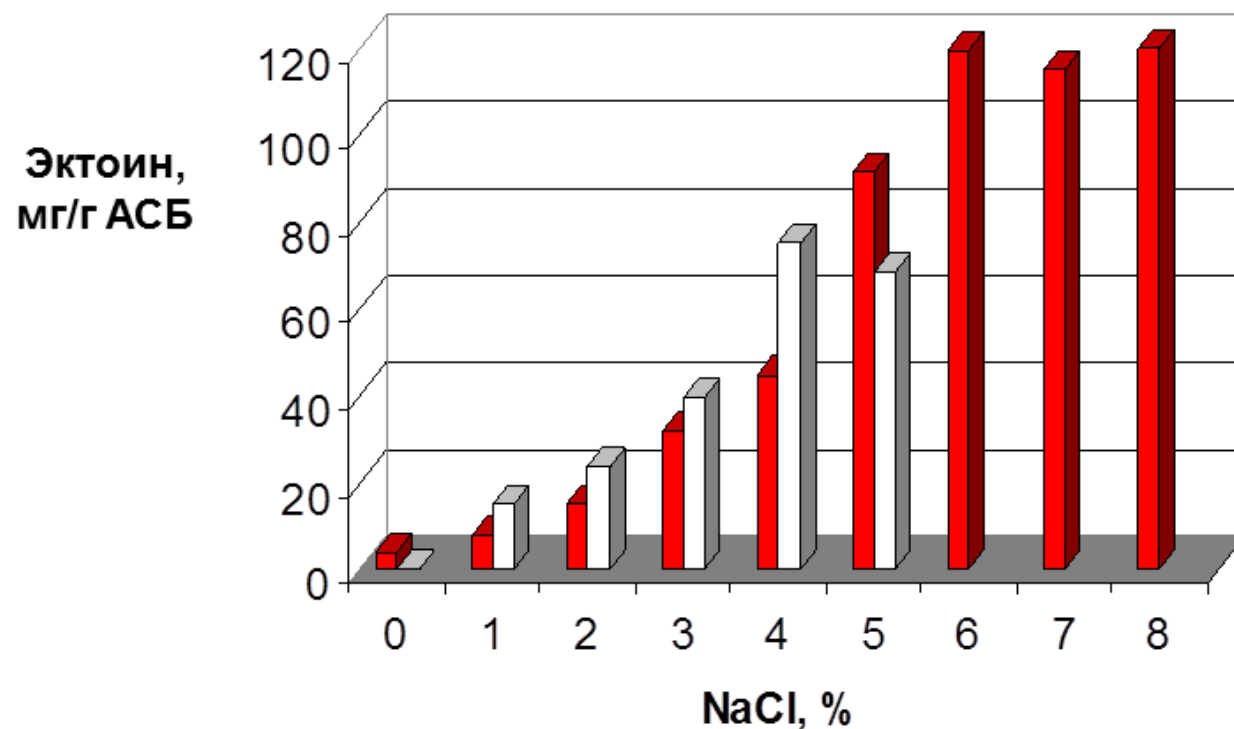
Косметика:

в кремах как увлажнитель кожи, повышает устойчивость к УФ облучению

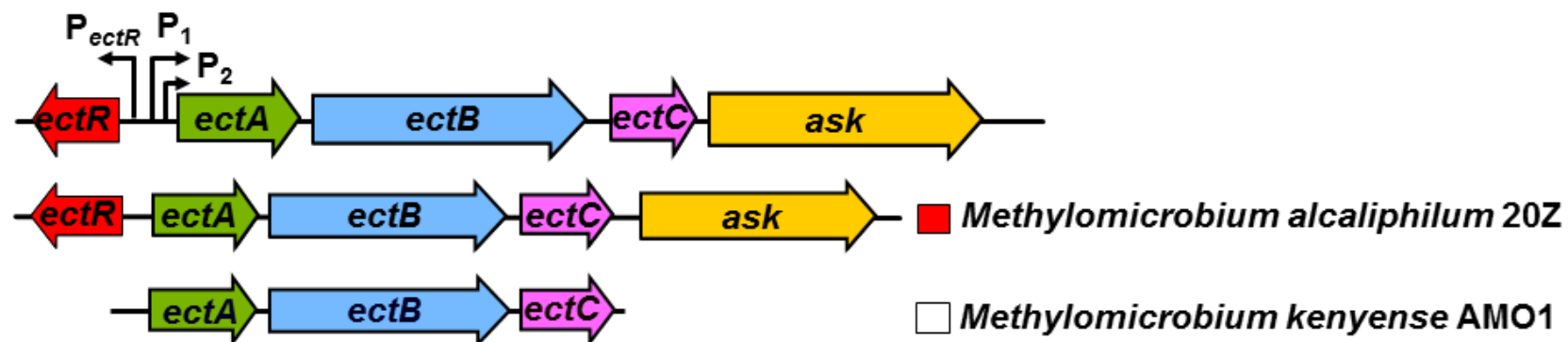
Путь биосинтеза эктоина у аэробных метилотрофных бактерий



Внутриклеточные уровни эктоина у метанотрофов



Структуры эктоинового оперона у аэробных метилотрофов



Лабораторный регламент синтеза эктоина из метанола



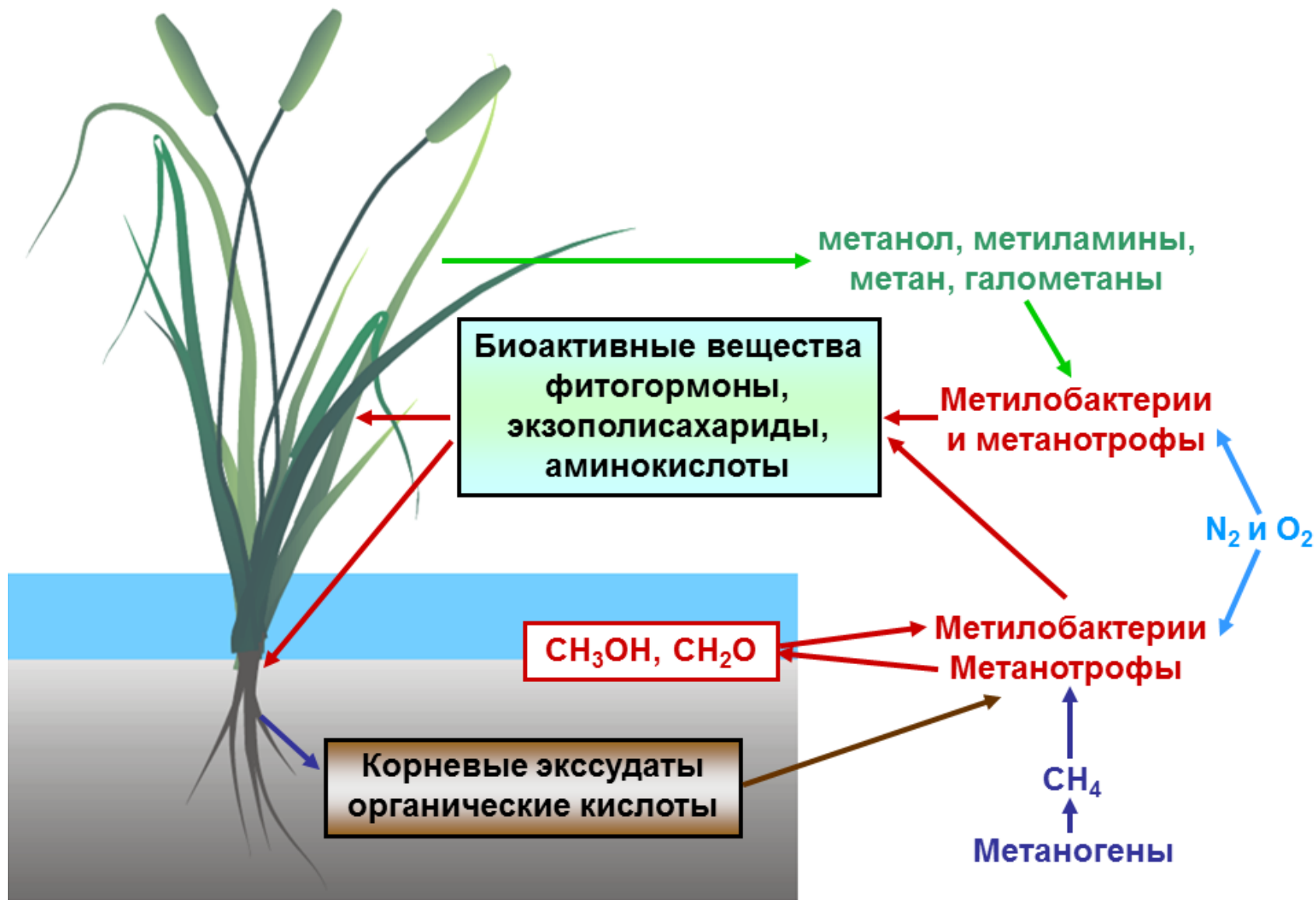
Основные параметры культивирования на метаноле:

$t = 29^\circ\text{C}$, $p\text{O}_2 = 25 - 35\%$, $\text{pH } 7.9$, $\text{NaCl} - 5\%$

Выход биомассы: 40 г/л АСБ, содержащей 15% эктоина

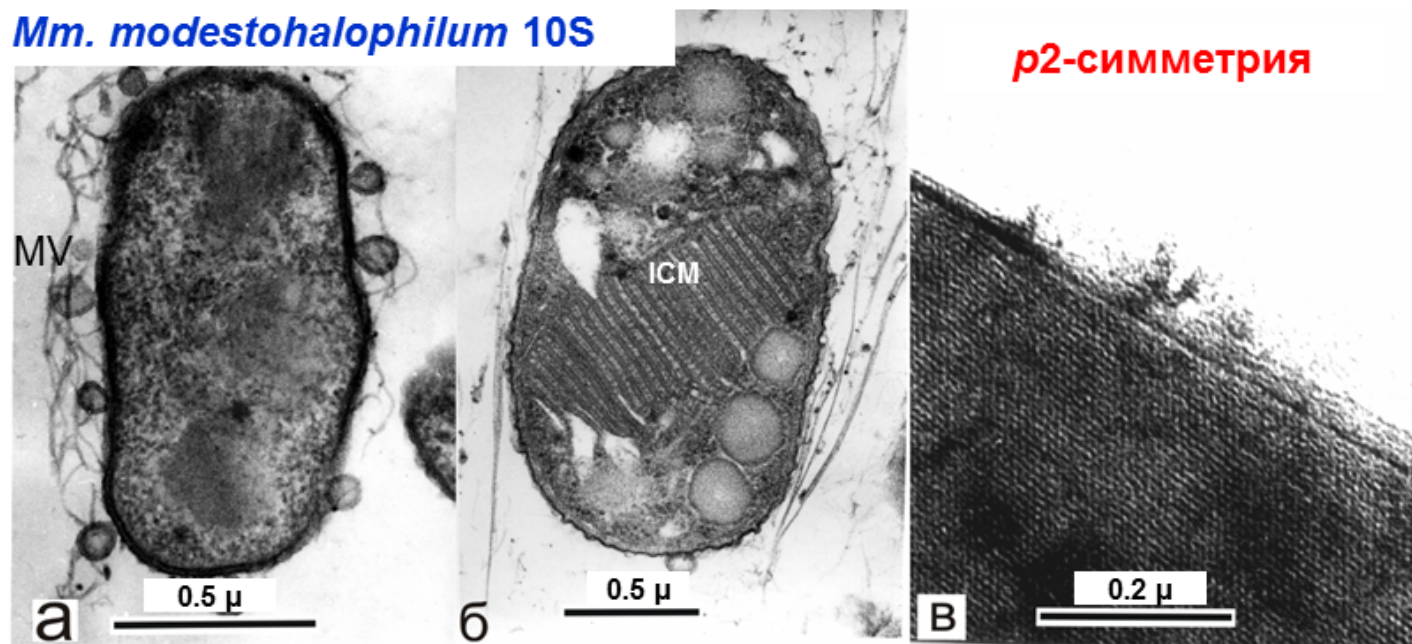
Выход эктоина: 4.2 – 4.5 г/л (60% чистоты), 3.5 г/л (90% чистоты)

Взаимоотношения (ан)аэробных метилотрофов с растениями

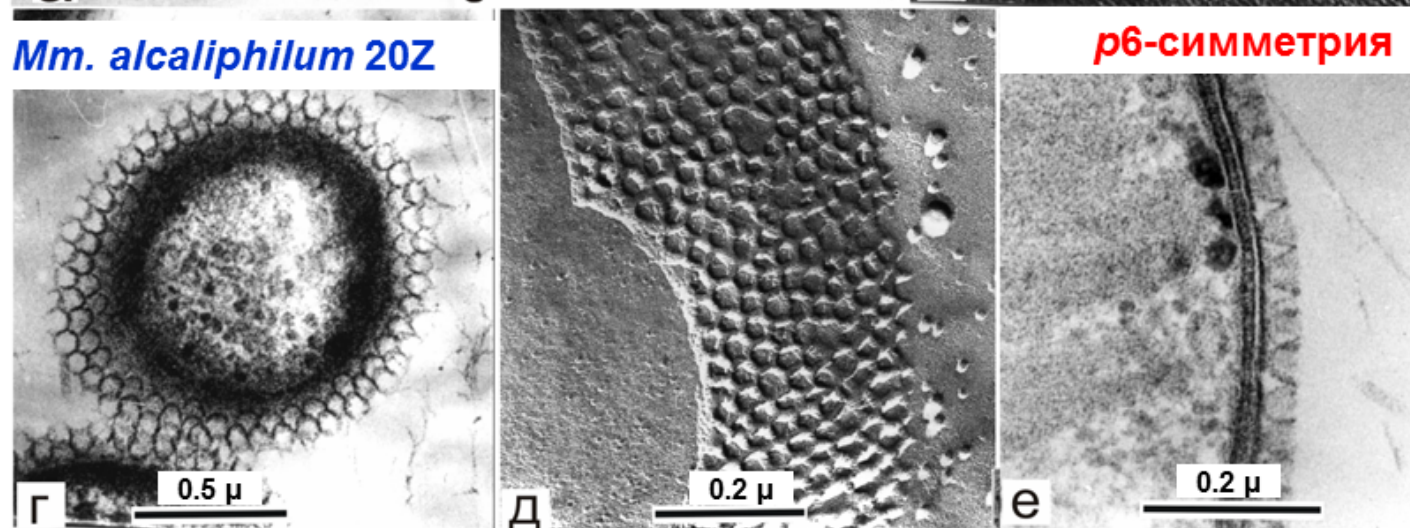


S-слои галоалкалофильных метанотрофов

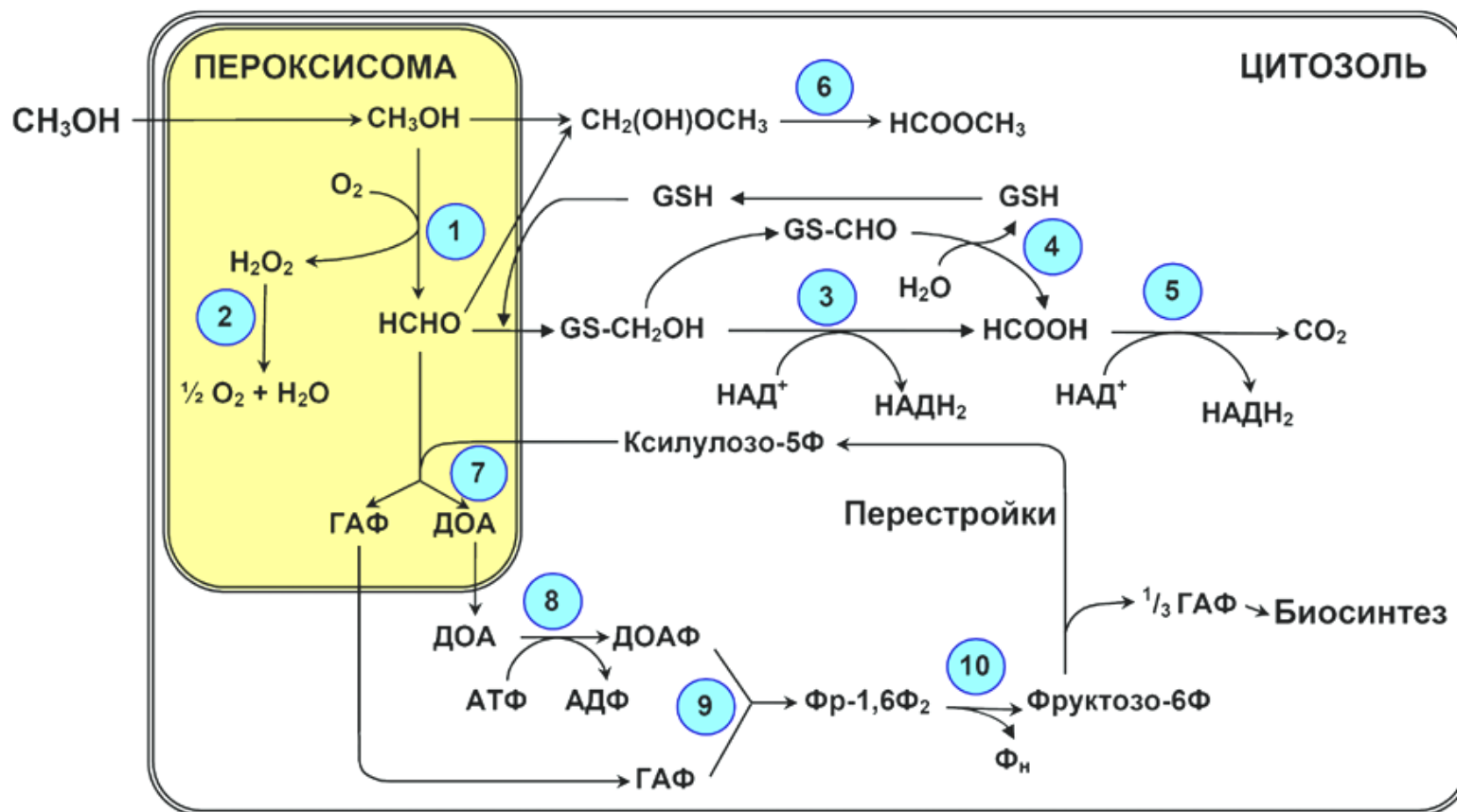
Mm. modestohalophilum 10S



Mm. alcaliphilum 20Z

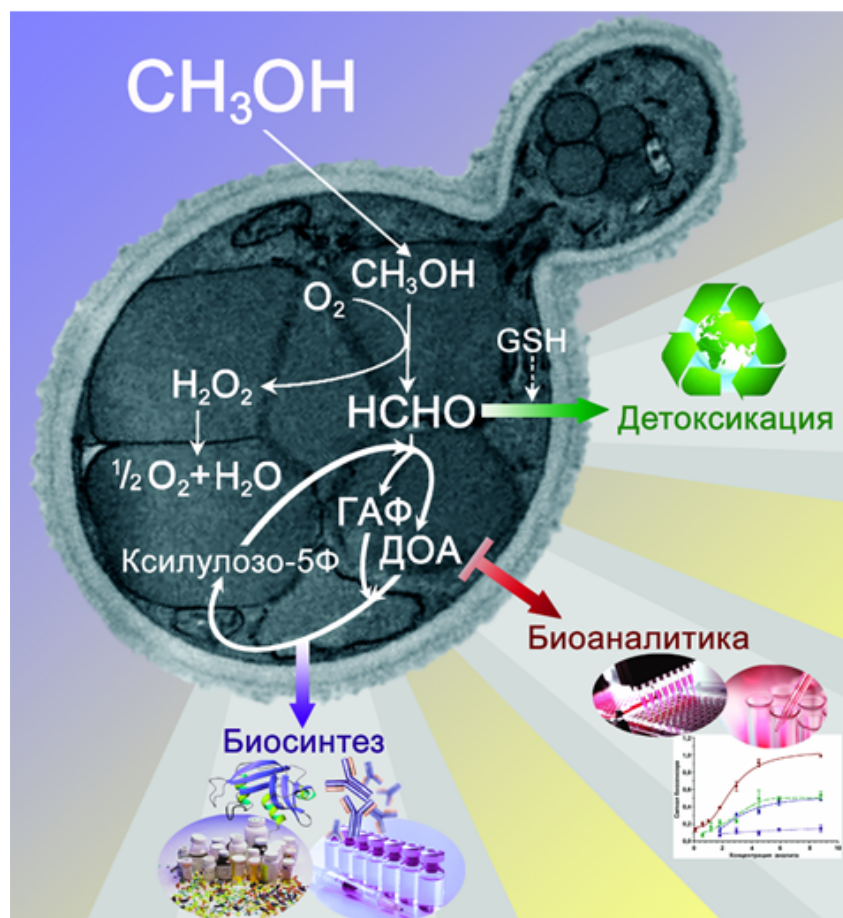


Компартментация метаболизма метанола у метилотрофных дрожжей



1 – алкогольоксидаза (АО), 2 – каталаза, 3 – формальдегиддегидрогеназа, 4 – S-формилглутатионгидролаза, 5 – формиатдегидрогеназа, 6 – метилформиат-синтаза, 7 – ДОА-синтаза, 8 – ДОА-киназа, 9 – альдолаза, 10 – Фр-1,6Ф₂-аза
ГАФ – глицеральдегид-3-фосфат, ДОА(Ф) – диоксиацетон(фосфат), Фр-1,6Ф₂ – фруктозо-1,6-бисфосфат, GS-CH₂OH – S-гидроксиметилглутатион, GS-CHO – S-формилглутатион, CH₂(OH)OCH₃ – гемацеталь, HCOOCH₃ – метилформиат

Метилотрофные дрожжи в биотехнологии



Как биоэлементы биореакторов для очистки сточных вод химической промышленности или воздуха помещений от метанола и формальдегида

Наборы для анализа концентраций спиртов и формальдегида (ФА) на основе очищенных ферментов метилотрофных дрожжей

Клетки и очищенные ферменты – чувствительные элементы биосенсоров на спирты, ФА, аминокислоты (L-лактат, аргинин), аспартам, хроматы и т.п.

Биосинтез белка одноклеточных (SCP), этанола, ФА, ацетальдегида, акролеина и других альдегидов, полилактида, диоксиацетона, глицерина, H_2O_2 , пирувата, лимонной кислоты, кофакторов (ФАД, GSH, АТФ/АМФ), ферментов (АО, ФА- и формиат-дегидрогеназ, каталаз, супероксиддисмутаза), пенициллина и широкого спектра рекомбинантных белков, в том числе с гликозилированием по «человеческому» типу

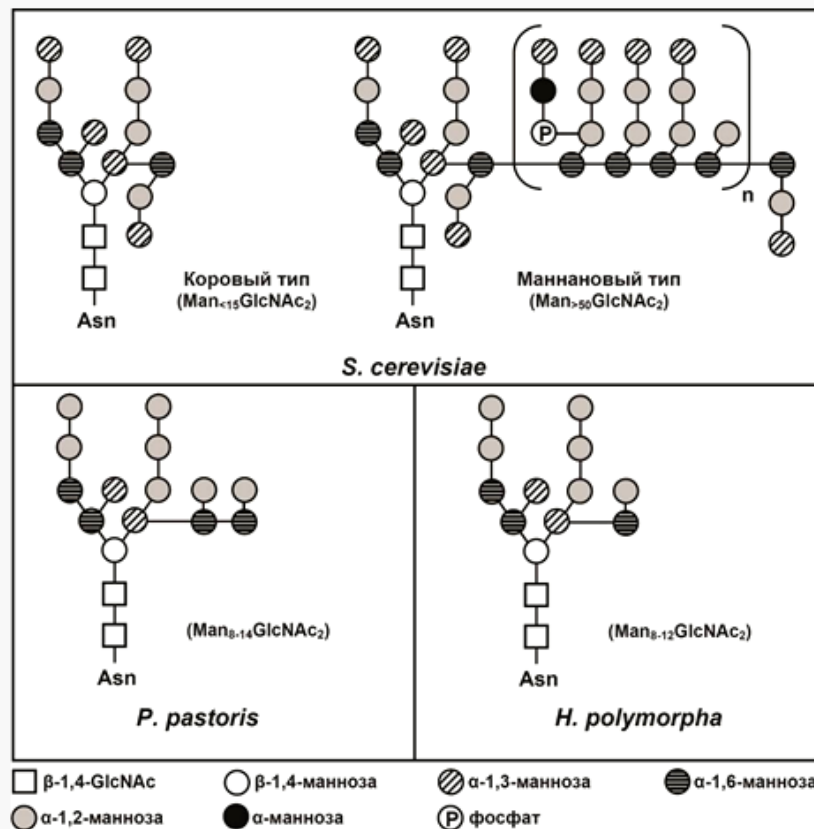
Экспрессионные системы метилотрофных дрожжей

Hansenula polymorpha
Pichia pastoris
Pichia methanolica } Invitrogen, USA
Candida boidinii в разработке



Пример общего дизайна интегративного экспрессионного вектора для трансформации метилотрофных дрожжей [Invitrogen, 2010]

N-связанные структуры олигосахаридов модифицированных гликопротеинов *S. cerevisiae*, *P. pastoris* и *H. polymorpha* [Kang, Gellissen, 2005]



GlcNAc – N-ацетилглюкозамин, Man – манноза

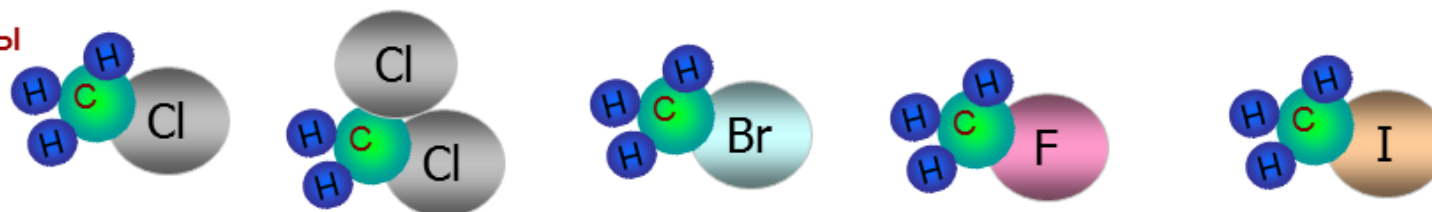
Метилотрофы как агенты биodeградации и биоремедиации

Для деградации токсичных C_1 - и C_n -соединений, содержащих связи:



C – Cl метилгалогиды, трихлорэтилен и другие галогенированные углеводороды

галометаны

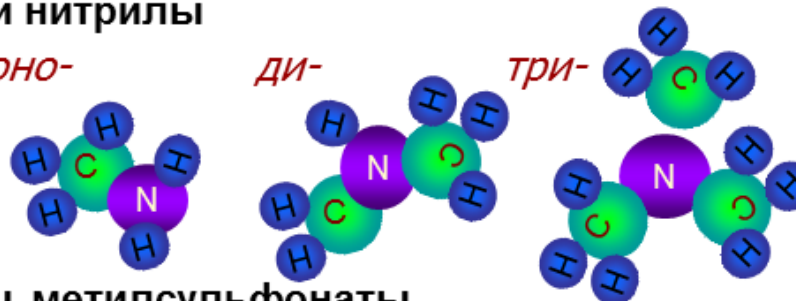


C – N метилированные амины, амиды и нитрилы

метиламины *моно-*

ди-

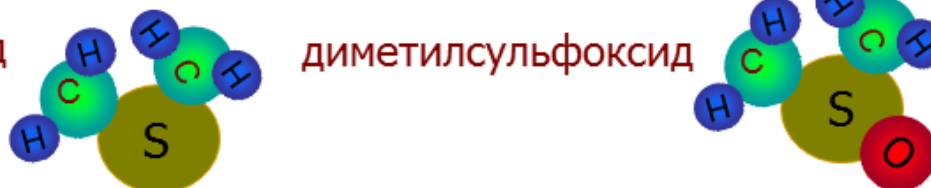
три-



C – S метилсульфиды, метилсульфаты, метилсульфонаты

диметилсульфид

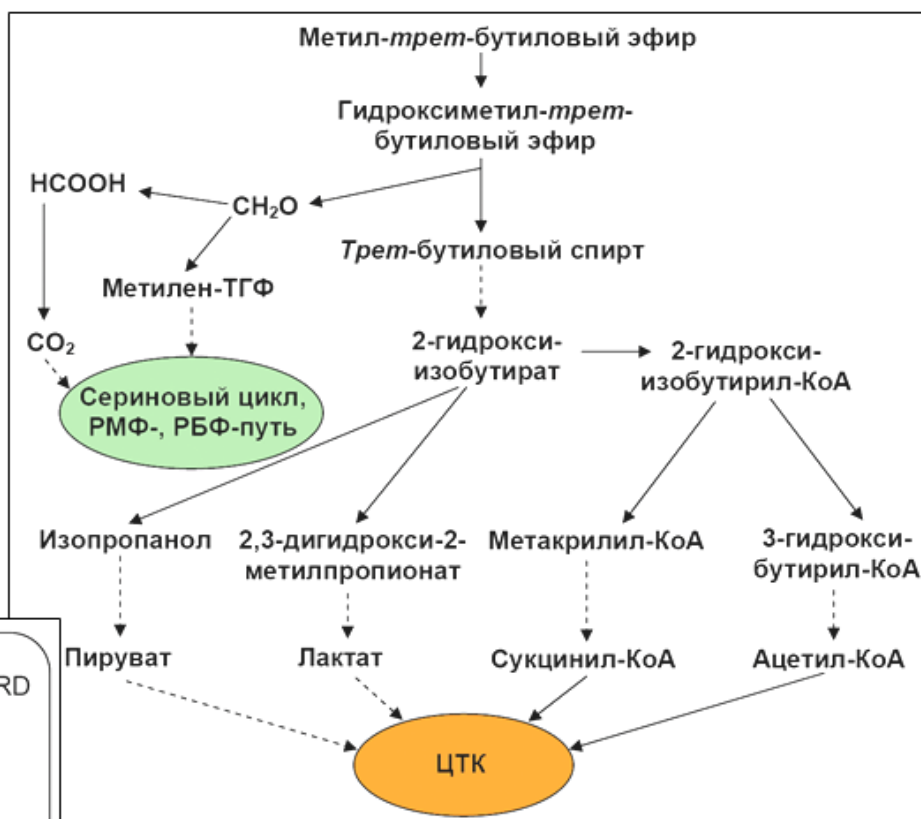
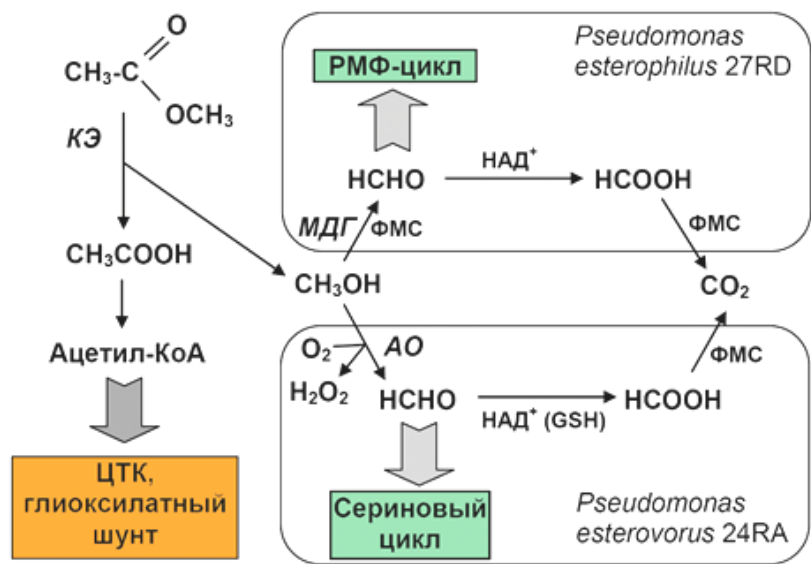
диметилсульфоксид



C – C метил- и этилацетат, метил-трет-бутиловый эфир (МТБЭ)

Пути деградации этилацетата и МТБЭ у аэробных метилотрофов

КЭ - карбоксилэстераза



Метилотрофы – перспективны для «зеленой» биотехнологии

- ✓ CH_4 и CH_3OH – доступные и возобновляемые источники С и Е для аэробных метилтрофов, метаболическая организация/регуляция которых хорошо изучена;
- ✓ идеальные хозяева для гомо- и гетерологичной экспрессии белков, обладающие сильными промоторами (МДГ, АО, и др.) и компартментизированным метаболизмом;
- ✓ эффективные продуценты биопротекторов и биостабилизаторов (эктоина, ПГБ/В, ЭПС, пигментов), а также S-слоев для точной ультрафильтрации (нанотехнологии, биомедицина);
- ✓ фитосимбионты или ‘маленькие фермеры’, удаляющие C_1 -метаболиты растений и поставляющие ауксины, цитокинины, витамин B_{12} и аммоний, тем самым ускоряющие рост гнотобионтов, регенерантов и эксплантов после генно-инженерных манипуляций. Используются также как антиоксиданты и защитники от патогенов растений (бактофил и метилобактерин);
- ✓ как агенты биоаналитики (чувствительные элементы биосенсоров), биodeградации и биоремедиации токсичных C_1 - и C_n -соединений, в том числе для снижения эмиссии взрывоопасного метана в угольных шахтах и свалках твердых бытовых отходов (ТБО).

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ/ТОЛЕРАНТНЫХ МЕТАНОТРОФОВ

- продуценты биопротекторов (эктоин), экстремозимов и стабильных биополимеров (полибутират, полисахариды);
- продуценты S-слоев для нанотехнологии и биомедицины в качестве ультрафильтрационных аффинных мембран и иммобилизационных матриц для иммуноферментного анализа;
- биоаналитические агенты (биосенсоры), агенты биodeградации алифатических и ароматических поллютантов, биоремедиации загрязненных экстремальных экосистем, дегазации угольных шахт;
- будучи устойчивыми к различным физико-химическим факторам, экстремофильные метанотрофы не требуют асептических условий культивирования и предпочтительны для биотехнологии.

Новые источники информации

Троценко Ю.А., Хмеленина В.Н. Экстремофильные метанотрофы // Отв. ред.: В.Ф. Гальченко. ОНТИ ПНЦ РАН, Пущино. 2008. 205 с.

Троценко Ю.А., Доронина Н.В., Хмеленина В.Н., Понаморева О.Н. Биология и биотехнология аэробных метилотрофов / Учебно-методическое пособие // Тула: Изд-во ТулГУ, 2009. 202 с.

Троценко Ю.А., Доронина Н.В., Торгонская М.Л. Аэробные метиловобактерии // Отв. ред.: В.Ф. Гальченко. Пущино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2010. 325 с.

Троценко Ю.А., Торгонская М.Л. Метилотрофные дрожжи // Отв. ред.: В.Ф. Гальченко. Москва: «ТР-Принт», 2011. 313 с.



Спасибо за внимание!