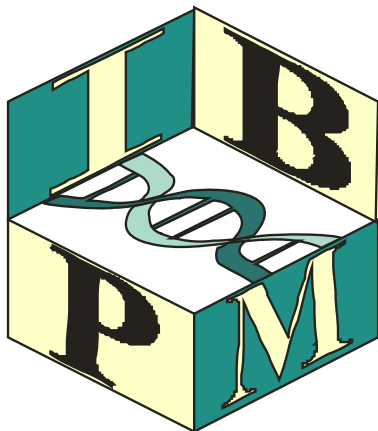




Аэробные метилотрофы – перспективные объекты биотехнологии

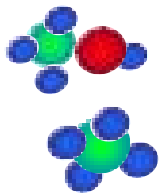
Ю.А. Троценко

Лаборатория метилотрофии

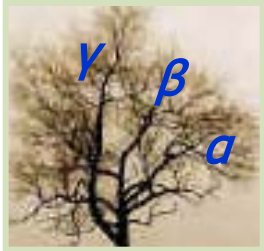
Институт Биохимии и Физиологии Микроорганизмов

им. Г.К. Скрыбина РАН

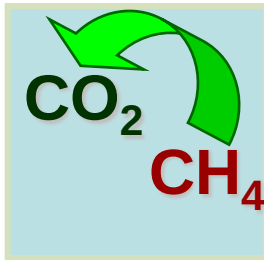
Пущино, Московская область



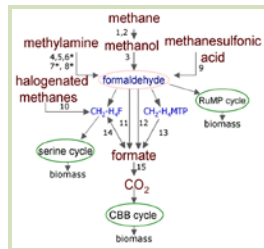
Метилотрофы – микроорганизмы, использующие метан и его окисленные или замещенные производные как источники углерода и энергии; основные участники глобального цикла C_1 -соединений.



Метилотрофия широко распространена в микробном мире, в частности, у 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 .

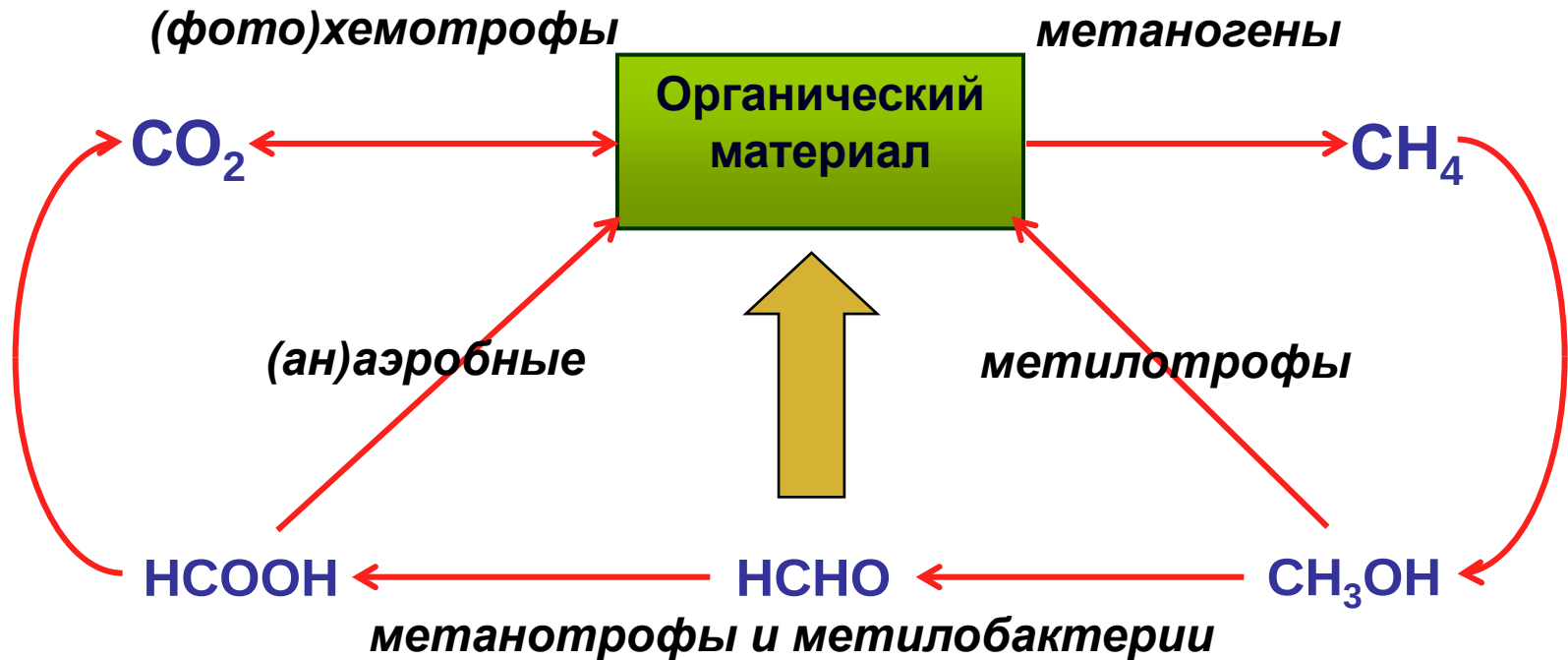


Метилотрофы реализуют уникальные пути C_1 -окисления (кофакторы - PQQ, GSH, НАД (Ф)+, ТГФ, ТГМП) и C_1 -ассимиляции: сериновый и пентозофосфатные с участием специфических генов (> 100) и ферментов (> 20).



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 Зёнгера в глобальных биосферных циклах углерода (Гт С/г)

Парниковые
газы:

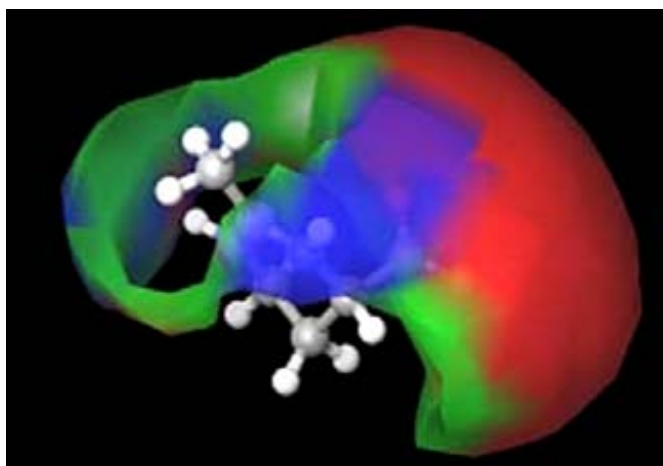
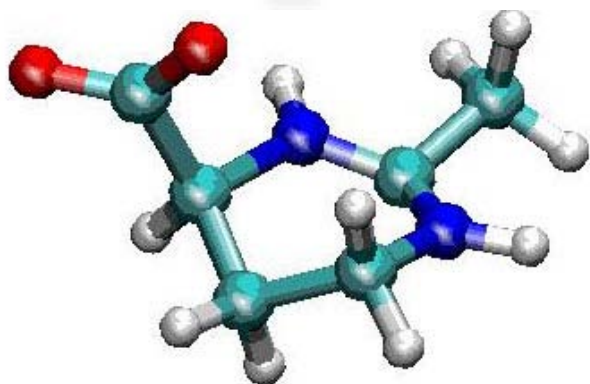
CO_2 ~ 1500

CH_4 ~ 800 (наибольший "парниковый" эффект)

CH_3OH ~ 300

Аэробные метилотрофы как агенты биосинтеза

- **Продукция белка одноклеточных (Single Cell Protein, SCP):**
Прутин (Англия), Провестин (США), Пробион (ФРГ),
Бипроtein (Норвегия), Гаприн и Меприн (Россия)
- **Биосинтез алифатических и ароматических аминокислот:**
серин, метионин, триптофан, тирозин, фенилаланин, эктоины
- **Биосинтез биополимеров:**
полигидроксibuтират/валерат (ПГБ/В),
экзополисахариды (ЭПС),
пигменты (каротиноиды, меланины, пиовердин)
цитохромы
- **Биосинтез витаминов и коферментов:**
Рибофлавин (B_2), цианкобаламин (B_{12}),
Флавинмоно- 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

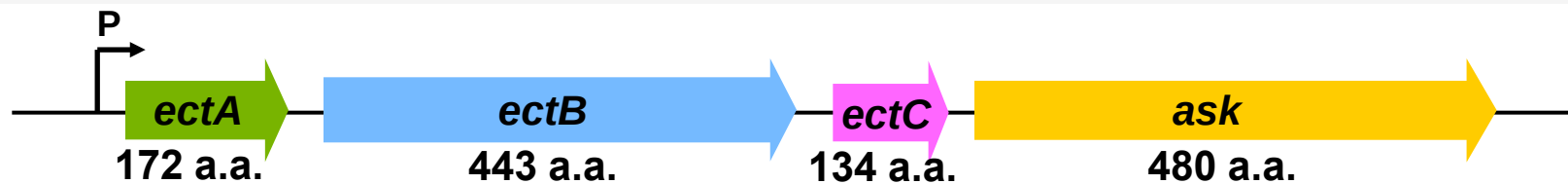
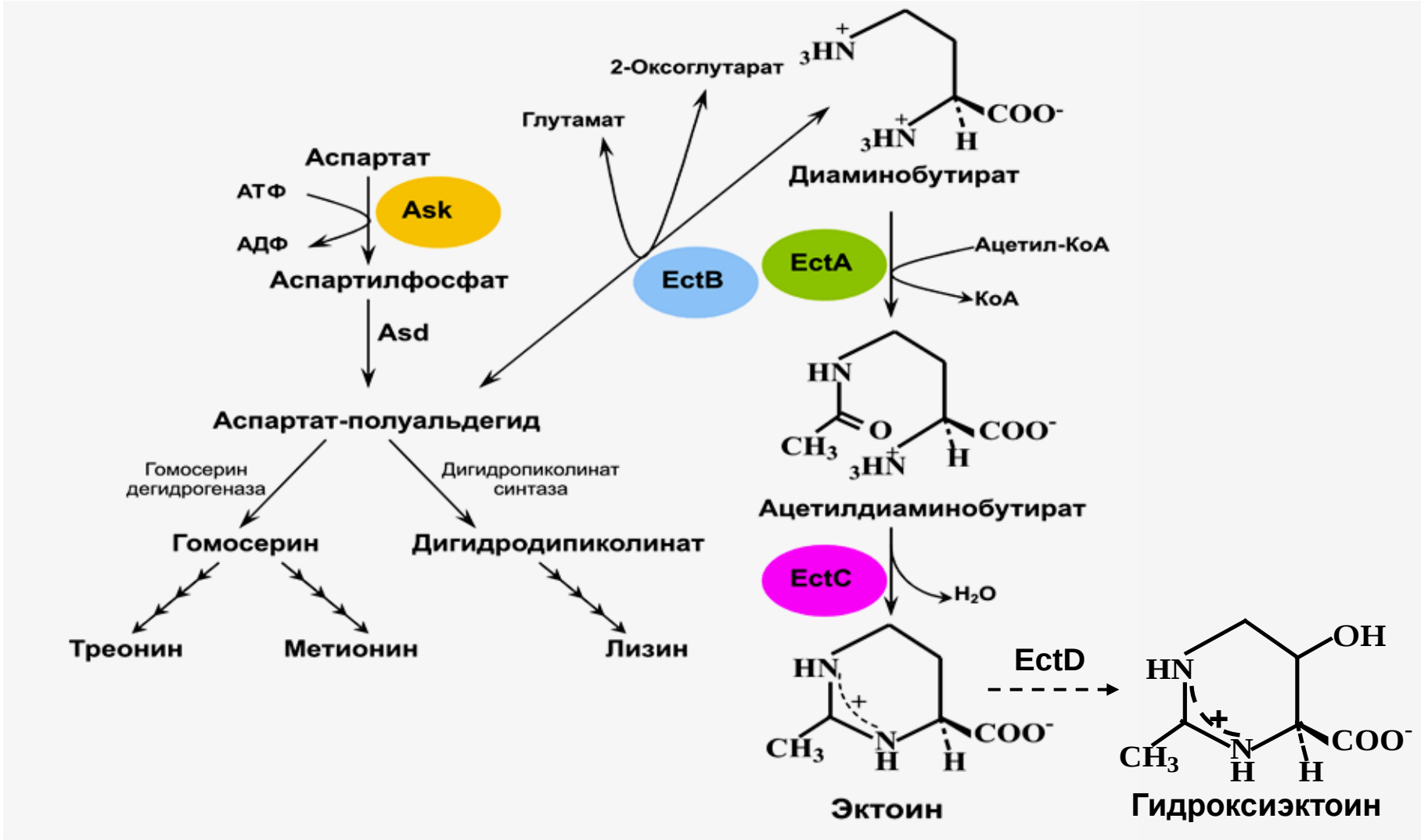
Медицина:

биопротектор клеток при радио- и химиотерапии

Косметика:

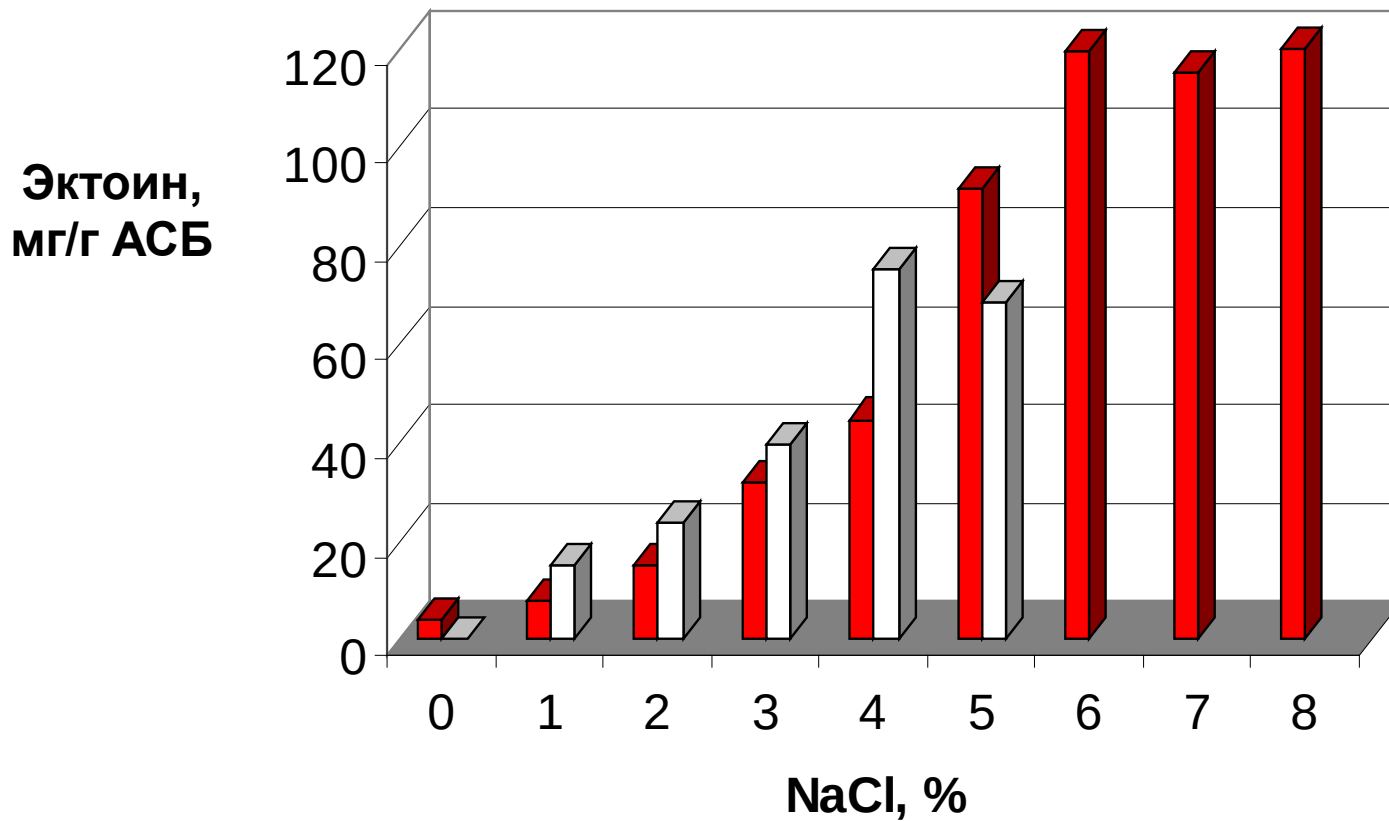
в кремах как увлажнитель кожи, повышает устойчивость к УФ облучению

Путь биосинтеза эктоина у аэробных метилотрофных бактерий

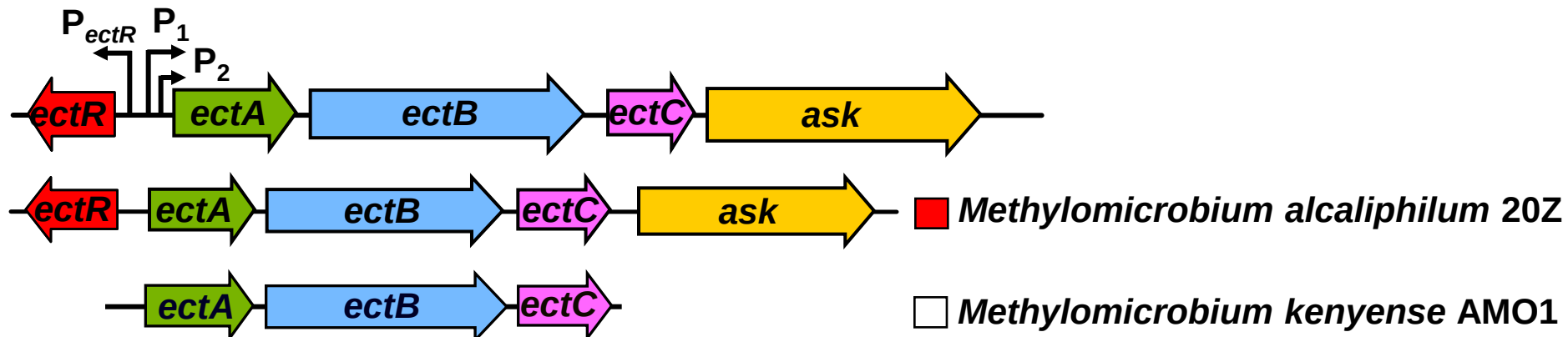


ДАБ-ацетилтрансфераза ДАБ-трансаминаза Эктоинсинтаза Аспараткиназа

Внутриклеточные уровни эктоина у метанотрофов



Структуры эктоинового оперона у аэробных метилотрофов



Лабораторный регламент синтеза эктоина из метанола



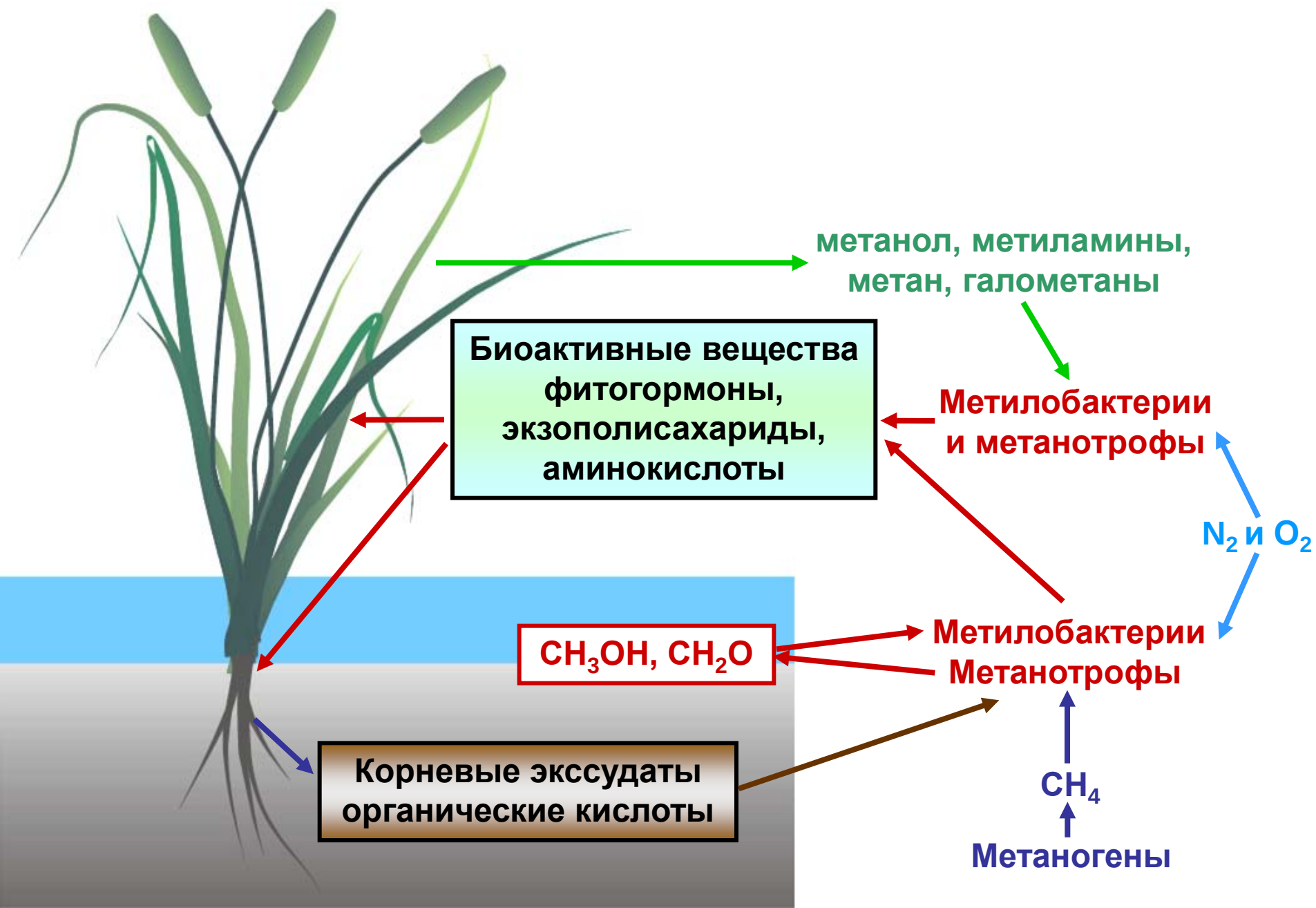
Основные параметры культивирования на метаноле:

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

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

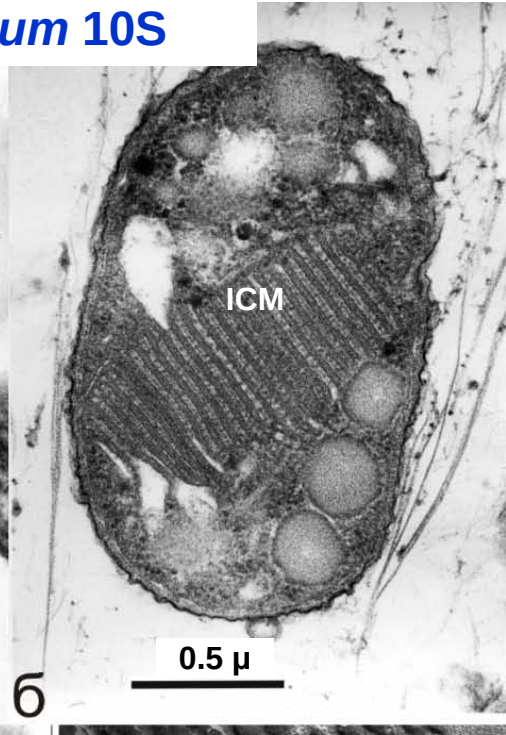
Выход эктоина: 4.2 – 4.5 г/л (60% чистоты), 3.5 г/л (90% чистоты)

Взаимоотношения (ан)аэробных метилотрофов с растениями

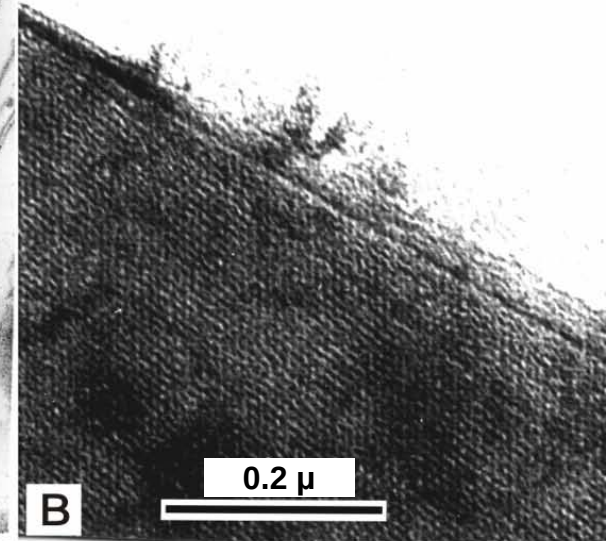


S-слои галоалкалофильных метанотрофов

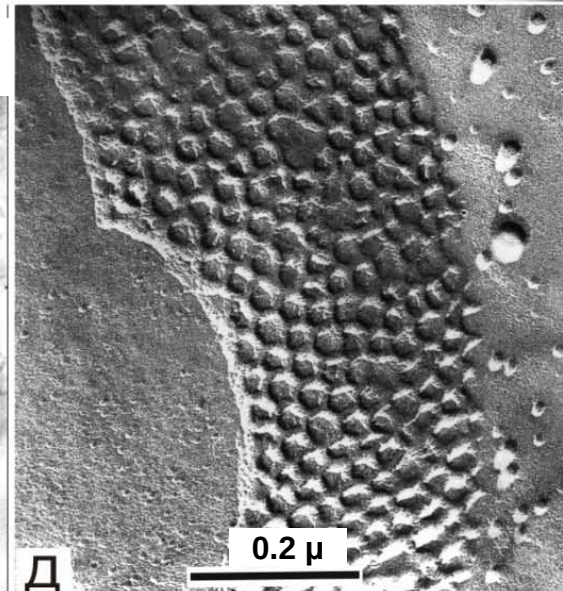
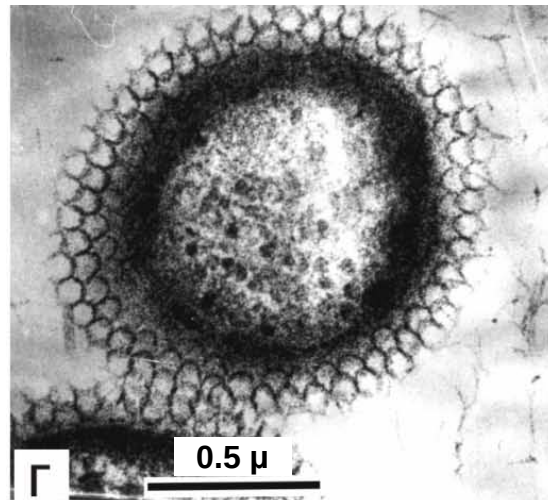
Mm. modestohalophilum 10S



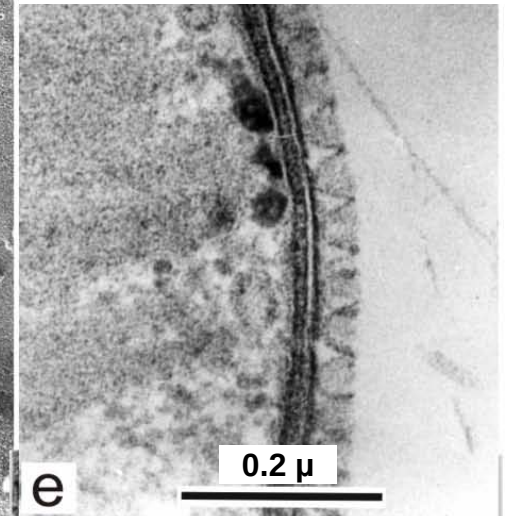
***p*2-симметрия**



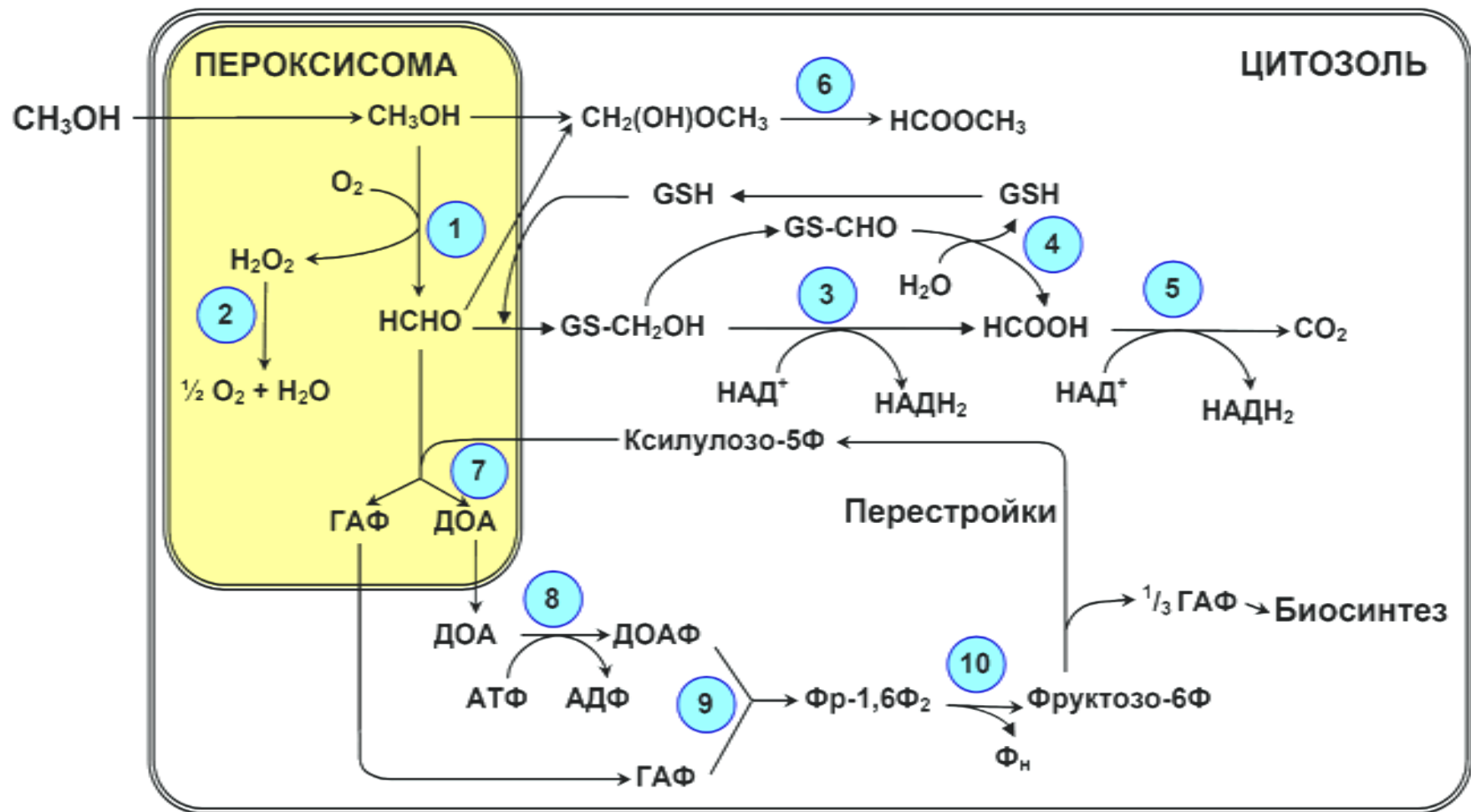
Mm. alcaliphilum 20Z



***p*6-симметрия**

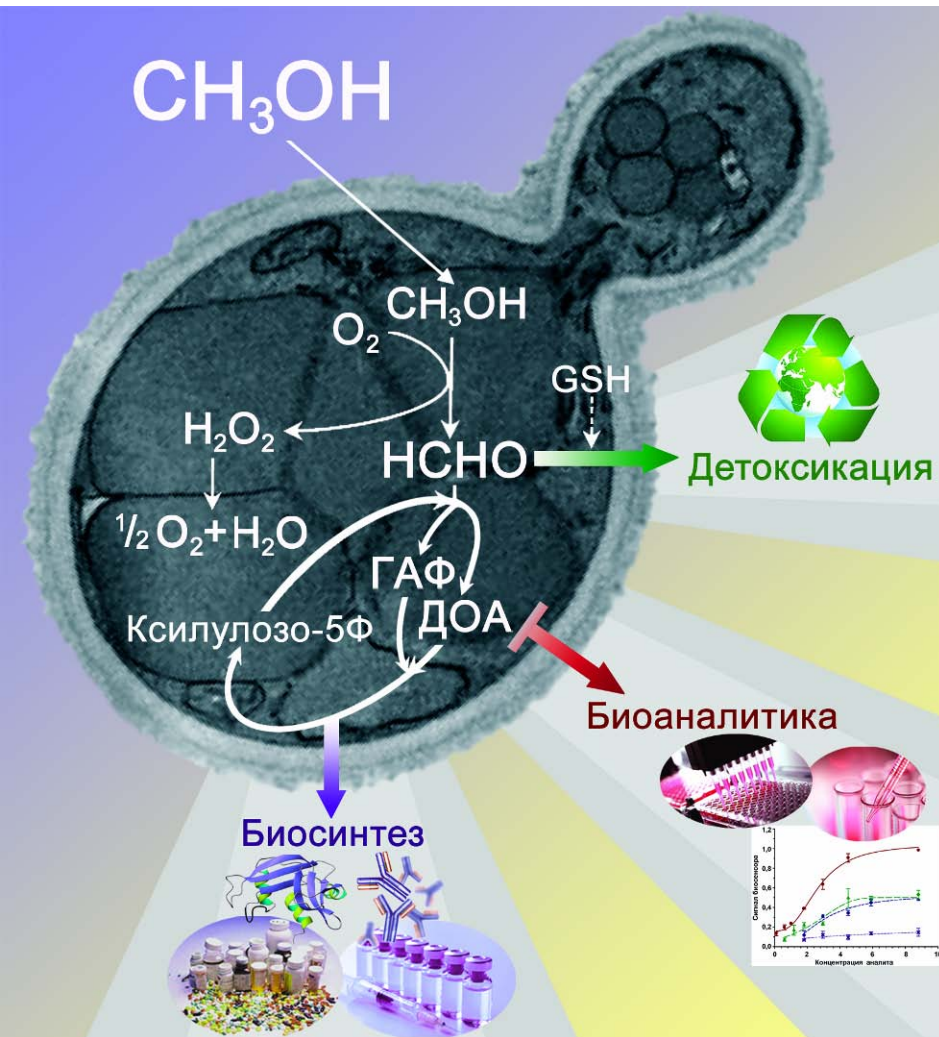


Компартментация метаболизма метанола у метилотрофных дрожжей



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 – гемиацеталь, 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

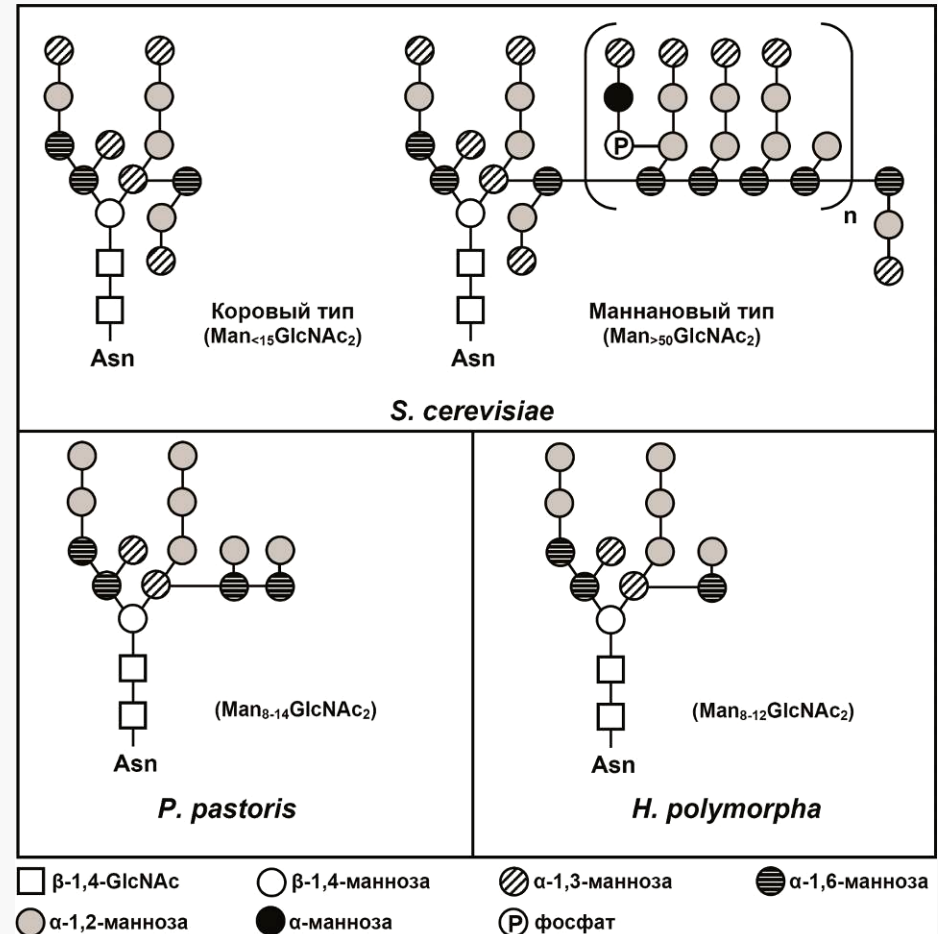
Экспрессионные системы метилотрофных дрожжей

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]

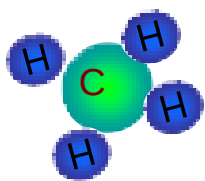


GlcNAc – N-ацетилглюкозамин, Man – манноза

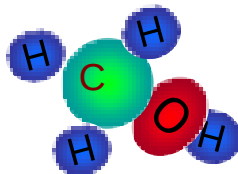
Метилотрофы как агенты биodeградации и биоремедиации

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

метан

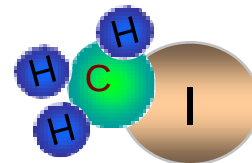
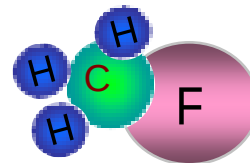
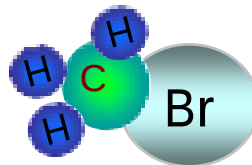
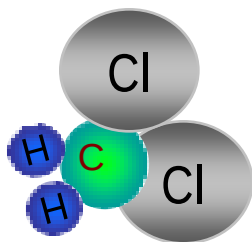
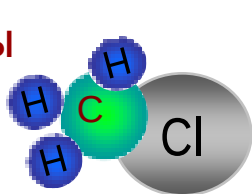


метанол



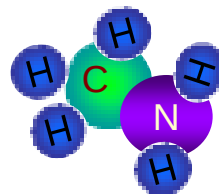
C – Cl метилгалиды, трихлорэтилен и другие галогенированные углеводороды

галометаны

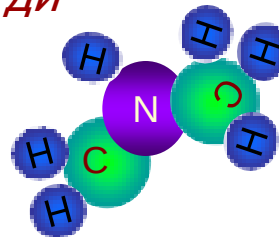


C – N метилированные амины, амиды и нитрилы

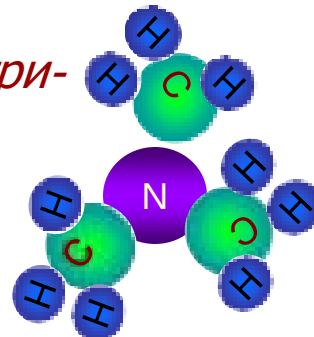
метиламины *моно-*



ди-

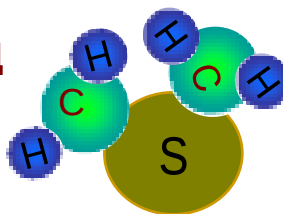


три-

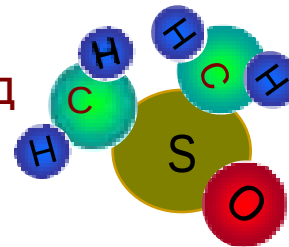


C – S метилсульфиды, метилсульфаты, метилсульфонаты

диметилсульфид



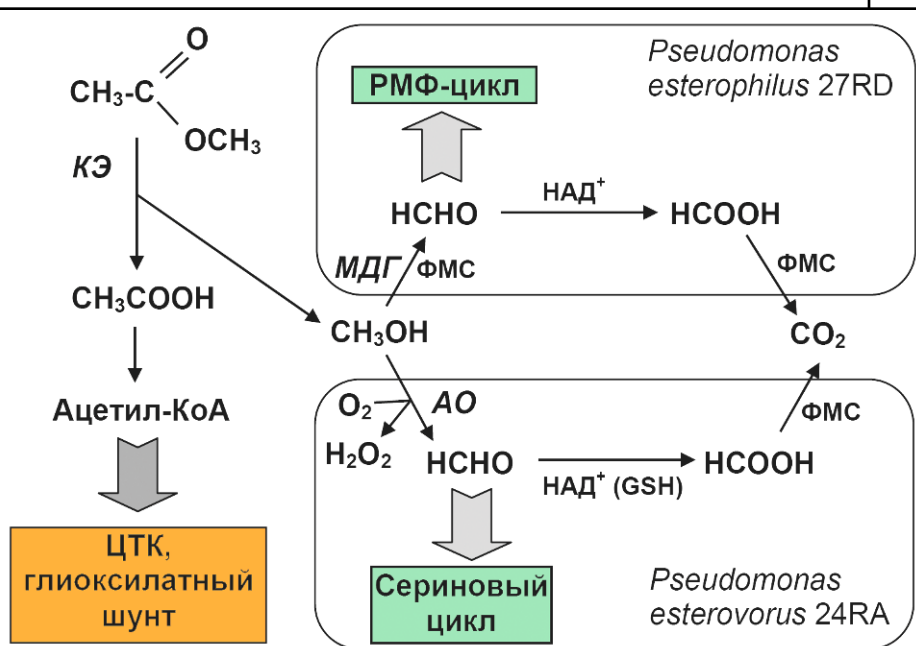
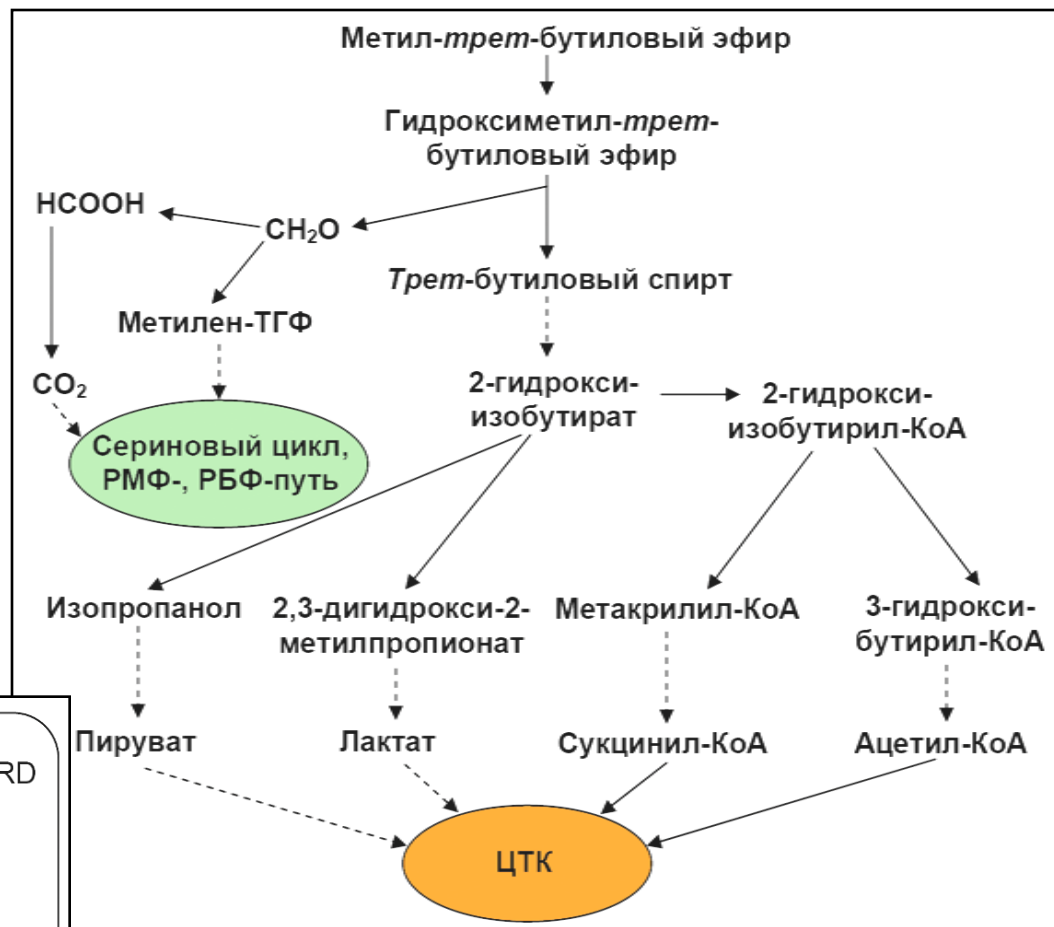
диметилсульфоксид



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 компартментизованным 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.

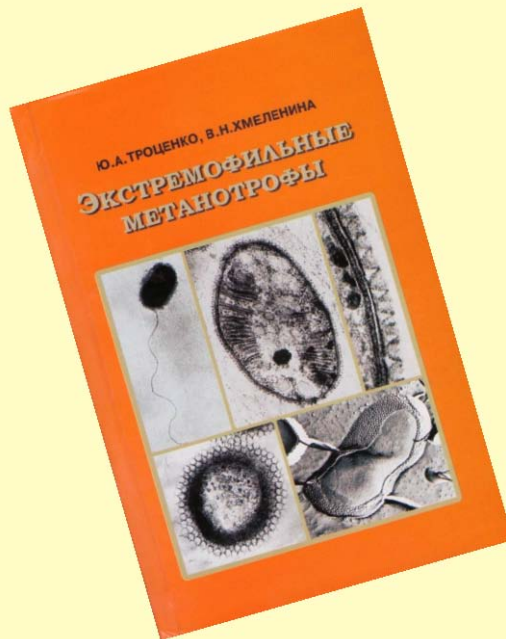
Новые источники информации

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!