

УДК 579.6

Аэробные метилотрофы – перспективные объекты современной биотехнологии

Ю.А. Троценко*, М.Л. Торгонская

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г.К. Скрябина РАН,
Россия 142290, Московская обл., Пущино, пр. Науки, 5¹*

Received 10.09.2012, received in revised form 17.07.2012, accepted 24.09.2012

В статье проанализированы и обобщены тенденции развития представлений о реализации уникального метаболизма мультифункциональных метилотрофных бактерий и дрожжей в различных сферах биотехнологии: биосинтезе, биокатализе, биоаналитике и биоремедиации.

Ключевые слова: аэробные метилотрофные бактерии, метилотрофные дрожжи, белок одноклеточных, синтез биополимеров, продукция гомо- и гетерологичных белков, биопротекторы, биокатализ, биodeградация, биоаналитика.

В промышленной биотехнологии важный ценовой фактор представляет углеродное сырье, которым обычно служат углеводы или углеводсодержащие субстраты (Baerends et al., 2008). В связи с этим весьма заманчиво получать целевые продукты на основе сравнительно дешевого непищевого сырья – метана или метанола, последний может быть получен из нефти, угля и древесины. Помимо природного газа источником метана для биотехнологии может являться его микробиологическая эмиссия при разложении отходов животноводческих комплексов и захоронений твердых бытовых отходов (ТБО). Вклад полигонов ТБО в глобальную эмиссию метана в мире оценивается $(35-73) \times 10^{12}$ г в год (10-20 %

от антропогенной и 6-12 % от общей глобальной эмиссии), а в РФ – $(500-900) \times 10^9$ г (Ноженикова и др., 2006). Идеальным источником дешевого метанола служит попутный газ, сжигаемый при нефтедобыче (~50 млрд м³/год в РФ). Кроме того, мировое производство метанола (50 млн т/год) не зависит от сезонных изменений и погодных условий, что выгодно отличает его от сырья сельскохозяйственного происхождения. В этой связи микроорганизмы, способные использовать метан и метанол для синтеза полезных продуктов, представляют очевидный интерес для современной биотехнологии.

Таковыми микроорганизмами выступают метилотрофы, использующие в качестве ис-

* Corresponding author E-mail address: trotsenko@ibpm.pushchino.ru

¹ © Siberian Federal University. All rights reserved

точников углерода и энергии широкий спектр (>50) C₁-соединений биогенного и абиогенного происхождения от предельно восстановленного CH₄ до предельно окисленного CO₂: метанол, формальдегид, формиат, диметилловый эфир, метилированные амины, галометаны, метилсульфиды, метилсульфоксиды, тиоцианаты и др. Многие из этих соединений обладают цитотоксическим и канцерогенным действием, а также ответственны за так называемый парниковый эффект, поскольку ис­тощают озоновый слой атмосферы. Аэробные метилотрофы выполняют уникальную функцию природного биофильтра на пути эмиссии C₁-соединений в атмосферу и играют жизненно важную роль в глобальных циклах углерода (рис. 1), что является причиной большого интереса к исследованию их биоразнообразия, особенностей экофизиологии и метаболизма.

Метилотрофия широко распространена в микробном мире, известно более 50 родов метанотрофов и мети­лобактерий, относящихся к *α*-, *β*-, *γ*-*Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, а также несколько родов метилотрофных дрожжей. Метанотрофы представляют собой высокоспециализированную группу бактерий,

способных расти на CH₄, метилобактерии используют в качестве источников углерода и энергии замещенные или окисленные производные метана, а метилотрофные дрожжи – метанол. Аэробные метилотрофы реализуют уникальные пути C₁-окисления (с участием хиноновых, птериновых, тиоловых и никотинамидных кофакторов) и C₁-ассимиляции (пентозофосфатные и сериновый циклы) с участием более 20 специфических ферментов, кодируемых >100 генами.

Доступность C₁-соединений (метана и метанола) как возобновляемых субстратов и способность синтезировать полезные продукты, довольствуясь минимальными, в сравнении с гетеротрофами, питательными субстратами, а также разлагать широкий спектр высокотоксичных соединений обуславливают перспективность аэробных метилотрофов для биотехнологии, биоаналитики и биоремедиации и возрастающий коммерческий интерес к этим микроорганизмам.

Аэробные метилотрофы как агенты биосинтеза

Аэробные метилотрофы используют в различных биопроцессах для получения

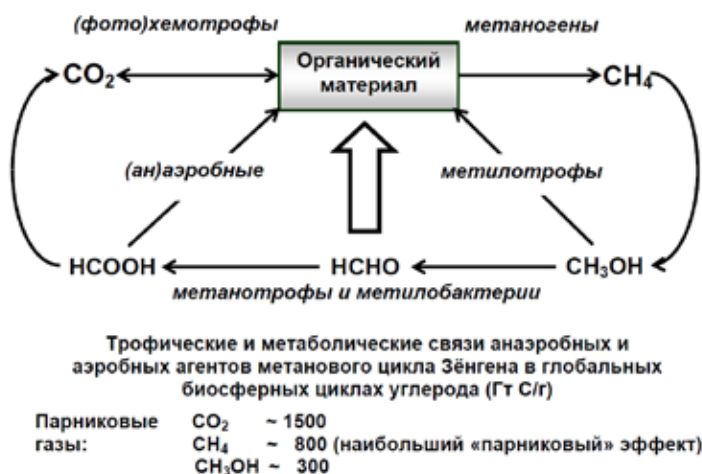


Рис. 1. Роль аэробных метилотрофов в биосферных циклах углерода метана и метанола



Рис. 2. Аэробные метилотрофы – перспективные объекты «зеленой» биотехнологии

широкого спектра продуктов, таких как кормовой белок, биodeградебельный полимер поли-β-гидроксибутират/валерат, пигменты, экзополисахариды, препараты гомологичных ферментов, рекомбинантные, в том числе «гуманизированные», белки, компоненты электронно-транспортной цепи, витамины, коферменты, аминокислоты, а также соединения для химической промышленности (рис. 2) (Троценко, Хмеленина, 2008; Троценко и др., 2010; Троценко, Торгонская, 2011).

Получение кормового белка (SCP, Single Cell Protein)

Аэробные метилотрофы могут быть источником кормового белка, проблема дефицита которого остается нерешенной во многих странах и является одной из причин низкой эффективности работы птицефабрик

и животноводческих комплексов. Так, в качестве белковой добавки в корма было предложено использовать биомассу метилотрофов, которая по составу и количеству незаменимых аминокислот сопоставима с рыбной и соевой мукой и даже имеет определенные преимущества относительно таких продуктов растительного происхождения, как хлеб из пшеничной муки (Bodrossy, Kovacs, 1994). В этой связи оказались особенно перспективными метилотрофы с рибулозомонофосфатным (РМФ) путем C_1 -ассимиляции, поскольку их биомасса переваривалась наиболее эффективно (85-98 %), имела наивысшее содержание белка (до 70 %) и лизина и наименьшее – нежелательных жирных кислот с нечетным числом углеродных атомов. Метилотрофы с сериновым и рибулозобисфосфатным (РБФ) путями C_1 -метаболизма

демонстрировали более скромные результаты (Плясов, 1988).

Метилотрофы с РМФ-путем также выгодно отличались от реализующих РБФ- и сериновый пути по показателям эффективности процесса производства SCP – удельной скорости роста, экономическому коэффициенту и питательной ценности продукта. Вследствие этого они оказались предпочтительными для крупномасштабного культивирования и получения кормового белка. Промышленное производство SCP из метанола с помощью облигатного метилотрофного продуцента *Methylophilus methylotrophus* AS1 было впервые реализовано фирмой ICI (Великобритания) в 1980-х гг. Непрерывный, полностью автоматизированный процесс ферментации проводили под давлением в асептическом биореакторе с рабочим объемом 1500 м³ и производительностью 50 000-70 000 т белка «Pruteen» в год (Westlake, 1986). Немецкая фирма Hoechst/Uhde также разработала промышленный процесс получения SCP на метаноле при культивировании метиловых бактерий *Methylophilus clara*. Использование двух биореакторов объемом 20 м³ с автоматическим поддержанием аэрации, pH, температуры, частоты разбавления и концентрацией метанола 0,005 % позволяло получать до 1000 т белкового продукта «Procion» в год. Метилотрофы-продуценты, использованные разными фирмами, очень близки по своим биотехнологическим показателям: способны расти при нейтральном pH и температуре около 40 °С, характеризуются высокими значениями сродства к метанолю, скорости роста (0,5-0,6 ч⁻¹), выхода биомассы (>50 % по углеродному субстрату) и содержания сырого протеина (~80 %).

Эффективная биотехнология получения SCP из метанола в непрерывном режиме с высокой плотностью клеток (> 130 г/л сухой

биомассы) и продуктивностью > 10 г/л×ч⁻¹ была разработана компанией Phillips Petroleum на основе метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris*. В СССР на основе метилотрофных дрожжей из метанола получали препарат меприн. Исследования потенциала применения *P. pastoris* в пищевой промышленности привели в 1988 г. к строительству завода с общим объемом ферментеров 100 000 л. Тем не менее в 1993 г. от идеи использования для промышленного производства пищевых продуктов и кормов пришлось отказаться, поскольку *P. pastoris* не имели статуса общепризнанно безопасных.

Производство кормового белка на метане оказалось дешевле, чем на метаноле, n-алканах или этаноле (Hammer, Harrison, 1980). При этом выход биомассы на метане и метаноле был одинаков, что указывало на потерю тепловой энергии при конверсии метана в метанол. Интересно, что бактерии, экспрессирующие мембранную форму метанмонооксигеназы (ММО), производили на 35 % больше биомассы на моль потребленного субстрата, чем экспрессирующие растворимую форму ММО.

Масштабное промышленное производство кормового белка «Гаприн» из природного газа с использованием термотолерантного метанотрофа *Methylococcus capsulatus* 874 было реализовано в СССР в середине 1980-х гг. В Норвегии в 1998 г. из природного газа фирмами Norferm и DuPont было налажено экологически чистое получение кормового белка «Bioprotein» с продуктивностью 8000 т/год и планируемым увеличением до 40000 т/год. В этом процессе использовали стабильную и высокопродуктивную смешанную культуру *Methylococcus capsulatus* Bath с сопутствующими гетеротрофными бактериями *Alcaligenes acidovorans* DB3 (6-8 % клеток в конечной биомассе), *Bacillus firmus* DB 5 и

Bacillus brevis DB4 (менее 1 % клеток). Роль *A. acidovorans* DB3 состояла в утилизации ацетата и пропионата, образующихся при соокислении сопутствующих газов – этана и пропана, а *B. brevis* DB4 и *B. firmus* DB5 – в утилизации метаболитов и продуктов лизиса клеток в среде культивирования (Bothe et al., 2002). Таким образом, была решена проблема ингибирующего действия на метанотрофную культуру продуктов кометаболизма. Для эффективности процесса конверсии использовали условия, способствующие экспрессии мембранной ММО, а также уникальный ферментер (290 м³) в виде замкнутой трубчатой петли (100 м × 1,9 м), в которую газы вводили в нескольких положениях. В итоге при непрерывном культивировании (0,05-0,25 ч⁻¹) вводимая смесь газов потреблялась на 95 %, а плотность биомассы достигала 25 г/л.

Данное производство сопровождалось разнообразными исследованиями качества продукта, питательной ценности, перевариваемости и безопасности, а также расширения спектра применения получаемого продукта. Установлено, что продуцируемая биомасса содержит 70 % белка, 10 % жиров, 7 % золы (минеральных веществ), 10 % нуклеиновых кислот, 10-25 г/кг фосфора, >310 мг/кг железа, >110 мг/кг меди, 0,2 % магния и 0,8 % калия. Аминокислотный профиль SCP имеет высокое содержание наиболее важных аминокислот (лизина, аргинина, треонина, метионина, триптофана и цистеина), а основными жирными кислотами являются C_{16:0} (~50 %) и C_{16:1} (~36 %) (Skrede, Ahlström, 2002). Сбалансированность по аминокислотному составу позволяет использовать продукт в качестве основного белка в кормах для рыб и домашних животных, свободного от генно-модифицированных организмов (ГМО) и природных токсинов и имеющего постоянный минеральный состав.

Из-за высокой стоимости газа и низких цен на альтернативные источники белка, такие как соя, крупнотоннажное производство SCP метилотрофов оказалось экономически неконкурентоспособным. Однако эффективность этого процесса существенно возрастает при получении из биомассы метилотрофов различных продуктов, имеющих коммерческое значение. Биомасса метилотрофов может быть использована в виде целых клеток или гомогенатов, автолизатов или гидролизатов, которые служат не только в качестве кормового белка, но и источником функциональных белков, аминокислот, основой для сред в промышленных ферментационных процессах (при культивировании лактобацилл), а также специальных добавок в корма, например как источник липидов (Троценко, Хмеленина, 2008). Обнаружено, что включение в диету животных липидов, экстрагированных из метанотрофов, уменьшает ожирение, уровень холестерина и липопротеинов в плазме крови, снижая риск коронарной сердечной недостаточности.

Гомогенаты и автолизаты клеток метилотрофов проявляют гелеобразующие и эмульгирующие свойства, что удобно для кормления животных в качестве единственного источника белка или в комбинации с другими источниками, для улучшения качества традиционных продуктов при смешивании, например, с альгинатами и каррагинатами, а также в пищевых продуктах человека. Гомогенизированный белковый препарат можно использовать как желирующий агент или эмульгатор в кормах в количестве до 10 % веса. Он способен заменять в пище или кормах для животных традиционные источники белка – рыбную муку, сою или плазму крови. Более того, оказалось, что биопроtein, подвергнутый тепловой обработке, улучшает вкусовые качества соусов и салатов.

Синтез биополимеров

В связи с глобальной экологической проблемой утилизации неразлагаемых в природе синтетических пластмассовых изделий (полиэтилен, поливинилхлорид, полипропилен), составляющих 40 % бытового мусора, все более актуальны разработка и производство биodeградируемых пластиков для нужд промышленности, медицины, сельского хозяйства и нанотехнологий. Аэробные метилотрофы могут служить продуцентами таких биополимеров – поли- β -гидроксibuтирата (ПГБ), его сополимера с β -гидроксивалератом (ПГБ/В) и полилактоида (Волова и др., 2006; Троценко и др., 2010).

Поли- β -гидроксibuтират, синтезируемый многими прокариотами как запасное вещество при несбалансированных условиях роста (дефицит азота, фосфора, кислорода или магния), обладает биоразлагаемостью, биосовместимостью и термопластичностью. Молекулярная масса этого полимера варьирует в зависимости от продуцента и условий культивирования от 50 до 2500 кДа. В качестве биоразлагаемых заменителей персистентных химических полимеров перспективны высокомолекулярные ПГБ и ПГБ/В, поскольку они обладают улучшенными физико-химическими (прочность, эластичность) и реологическими свойствами (Волова и др., 2006; Троценко и др., 2010).

В настоящее время себестоимость процесса получения ПГБ и ПГБ/В препятствует промышленному производству и широкому применению этих биополимеров вследствие высокой цены субстратов для культивирования гетеротрофных продуцентов. Экономически более выгодно получение ПГБ и ПГБ/В из метана и метанола, имеющих низкую цену, высокую чистоту, небольшую плотность и хорошую растворимость в воде. Наиболее перспективные продуценты ПГБ

и ПГБ/В – метилотрофы с сериновым путем C_1 -метаболизма, накапливающие наибольшее количество биополимеров.

Биотехнологический синтез ПГБ – это двухфазный процесс, разделенный на фазу накопления биомассы, которая сменяется фазой накопления продуктов, индуцируемой лимитированием по азоту. С помощью такой стратегии периодического культивирования «сериновых» метиловактерий в оптимизированных условиях с контролируемым соотношением источников углерода и азота получали до 50-60 % низкомолекулярного (50-60 кДа) или высокомолекулярного (1300-2000 кДа) ПГБ с выходом до 0,2 г/г метанола (Bouique et al., 1995). При непрерывном культивировании *Hyphomicrobium zavarzinii* максимальная продуктивность процесса составила 0,64 г/л \times ч⁻¹ (130 г/л), а содержание ПГБ варьировало от 40 до 59 % (Zhao et al., 1993).

ПГБ/В синтезируется «сериновыми» метиловактериями при росте на метаноле в присутствии пропанола, пентанола, пропионата и валерата. Отмечено, что добавление C_3 -субстратов приводит к более высокому содержанию β -гидроксивалерата в составе ПГБ/В, нежели внесение C_3 -соединений. Тем не менее пропанол и пропионат – наиболее предпочтительные по стоимости косубстраты для получения ПГБ/В. Низкая эффективность превращения этих соединений в β -гидроксивалерат у метиловактерий из-за сопутствующих реакций карбоксилирования пропионил-КоА и декарбоксилирования пропионата, пропанола и пентанола, стимулируемого метанолом, может быть преодолена путем получения мутантов, дефектных по генам пропионил-КоА-карбоксилазы, метилмалонил-КоА-мутазы и ферментов декарбоксилирования пропионил-КоА и валерил-КоА (Троценко, Белова, 2000). *Paracoccus methylutens*, реализующий РБФ-путь C_1 -ассимиляции, синтезировал ПГБ/В из

метанола в присутствии глицерина и гептана. У *Paracoccus denitrificans* к синтезу ПГБ/В (58 % полимера) приводило добавление к метанолу амилового спирта, при этом выход продуктов повышался до 0,97 г/г субстрата (Ueda et al., 1992).

В биосинтезе ПГБ участвуют β -кетотиолаза, НАДФН₂-зависимая ацетоацетил-КоА-редуктаза и ПГБ-синтаза. При росте *Methylobacterium extorquens* на метаноле источниками восстановительных эквивалентов для синтеза биополимера являются зависимый от тетрагидрометанооптерина (ТГМП) путь окисления формальдегида (ФА) и, в меньшей степени, цикл трикарбоновых кислот (ЦТК). При метилотрофном росте бактерий ЦТК функционирует менее активно, чем при выращивании на ацетате и бутирате, вероятно, из-за ингибирования ферментов высоким уровнем восстановительных эквивалентов, поставляемых ТГМП-путем. Предложенная модель координированного контроля ЦТК и биосинтеза ПГБ/В при росте продуцента на С₁- и С_n-субстратах позволяет получать сополимер с заданным соотношением мономеров и улучшенными физико-химическими характеристиками (Троценко, Белова, 2000).

Регуляция синтеза ПГБ детально изучена у «сериновых» метиловых бактерий *Methylobacterium rhodesianum* MB126 и *M. extorquens*. Важнейшими эффекторами, контролирующими потоки углерода в условиях синтеза ПГБ у этих метиловых бактерий, оказались уровни ацетил-КоА и НАД(Ф)Н₂. Иницирующие ферменты синтеза ПГБ и ЦТК (β -кетотиолаза и цитратсинтаза) конкурируют между собой за ацетил-КоА, поэтому регуляция путей достигается за счет разного сродства указанных ферментов к субстрату (K_m β -кетотиолазы и цитратсинтазы – 500 и 70 мкМ, соответственно) и посредством из-

менения внутриклеточных концентраций специфических эффекторов. Показано, что β -кетотиолаза ингибировалась низкими концентрациями КоА, а цитратсинтаза проявляла чувствительность к НАДН₂ (k_i = 20 и 150 мкМ, соответственно). Активность цитратсинтазы в экстракте (0.12 Е) была ниже, чем активность β -кетотиолазы (0,3 Е). При этом внутриклеточная концентрация КоА в ответ на индукцию синтеза ПГБ снижалась почти до нуля, в то время как уровень НАДН₂ уменьшался незначительно. Таким образом, при сбалансированном росте культуры на метаноле β -кетотиолаза ингибировалась КоА, а ацетил-КоА направлялся в ЦТК. Напротив, в лимите по азоту внутриклеточная концентрация НАДН₂ определяла только 25 % активности цитратсинтазы, уровень КоА быстро снижался, благодаря чему активность β -кетотиолазы и, следовательно, синтеза ПГБ значительно возрастала (Троценко, Белова, 2000).

Характерной особенностью регуляции синтеза ПГБ *M. rhodesianum* при метилотрофном или гетеротрофном росте выступает накопление биополимера в экспоненциальной фазе роста на фруктозе в отсутствие лимита по субстрату. На основании сравнения потоков углерода с активностями ферментов ЦТК и синтеза ПГБ, а также влияния экзогенного формата предположено, что у этого метилотрофа синтез ПГБ на метаноле в лимитированных условиях служит для стока избыточных электронов, тогда как при росте на фруктозе он обусловлен недостатком энергии.

Выявленные закономерности позволяют лучше понять принципы метаболической организации «сериновых» метиловых бактерий и служат научной основой для разработки технологий биосинтеза ПГБ и ПГБ/В из метанола и косубстратов (Троценко, Белова, 2000). Так, в результате проведенных комплексных исследований нами разработан лабораторный

регламент биосинтеза ПГБ на основе метанола.

Еще одним биоразлагаемым, биосовместимым и термопластичным полимером является *полилактид* (ПЛА) – полимер молочной кислоты, продуцируемый в настоящее время из растительного сырья (кукуруза, сахарный тростник). ПЛА применяется для производства изделий с коротким сроком службы (экологически чистая пищевая упаковка, одноразовая посуда, пакеты, средства личной гигиены), а также в медицине для производства хирургических нитей и штифтов и в системах доставки лекарств. В природных условиях срок разложения составляет от двух месяцев до двух лет. Среди метилотрофов для промышленного производства ПЛА перспективны метилотрофные дрожжи *Candida boidinii*, на основе которых путем разрушения гена пируватдекарбоксилазы *CbPDC1* и постановки под его промотор гена бычьей лактатдегидрогеназы получен наиболее эффективный дрожжевой продуцент L-лактата (до 1,79 г/л×ч⁻¹) (Osawa et al., 2009).

ПГБ, ПГБ/В, полилактид и их нанокomпозиты (например, с гидроксиапатитом) могут использоваться не только как упаковка, тара, пленки и посуда, но имеют перспективы широкого применения в медицине ввиду биосовместимости и биodeградеability. Производство разлагаемых биопластиков, включающихся в биосферные циклы, соответствует концепции экологически безопасного устойчивого развития. Следовательно, активный переход к использованию биопластиков в народном хозяйстве должен быть поддержан на государственном уровне.

К промышленно ценным бактериальным продуктам относятся и *экзополисахариды* (ЭПС) – углеводные полимеры, образующие на поверхности микробных клеток капсулу

и/или свободную слизь. ЭПС способны действовать на реологические свойства водных растворов и образовывать гели различной плотности при малых концентрациях, что используется в пищевой, фармацевтической, текстильной и нефтедобывающей промышленности. Метан и метанол – перспективные источники углеродного сырья для получения этих микробных биополимеров.

Способность синтезировать ЭПС в значительных количествах обнаружена у представителей метанотрофов I и X типов (*Methylomonas*, *Methylococcus*), выделяющих 0,05–0,23 г/л полимеров, реже – у II типа метанотрофов (Hou et al., 1978; Гринберг и др., 1992). Эти отличия обусловлены тем, что метанотрофы с РМФ-путем в качестве первичных продуктов C₁-ассимиляции синтезируют фосфосахара, а бактерии с сериновым циклом – C₂- и C₃-соединения, значит, в последнем случае синтез ЭПС требует энергоемких реакций глюконеогенеза. Тем не менее в стрессовых условиях метанотрофы II типа могут синтезировать ЭПС, как, например, *Methylocystis parvus* ОВВР после длительной адаптации к росту на 4 %-ном метаноле (Hou et al., 1978).

Поскольку варьирование физико-химических параметров может влиять на выход ЭПС, для получения этих биополимеров особенно перспективны экстремофильные продуценты, активные в широком диапазоне рН, солености, температур и концентраций метанола (Гринберг и др., 1992; Троценко, Хмеленина, 2008). Галоалкалофильные виды рода *Methyloicrombium* (*Mm. buryatense* и *Mm. alcaliphilum*) при росте на метаноле способны выделять в среду до 2,63 г/л ЭПС (Троценко, Хмеленина, 2008). Более того, использование термофильных метанотрофов и метилобактерий может сократить затраты на охлаждение ферментеров при культивировании.

Активными продуцентами ЭПС из метанола с конверсией до 40-44 % субстрата являются облигатные и факультативные метиловобактерии, реализующие, в основном, пентозофосфатные пути C_1 -метаболизма (*Methylophilus methylotrophus*, *Methylobacillus viscosus*, *Pseudomonas polysaccharogenes*, *Pseudomonas viscogena*) (Takayama et al., 1978; Misaki et al., 1979; Гринберг и др., 1992; Троценко и др., 2005). Биоконверсия C_1 -соединений в полисахариды лимитируется кислородом. Несмотря на то, что выходы ЭПС из метанола и глюкозы идентичны при пересчете на углерод, расход кислорода на образование ЭПС из метанола почти в 10 раз больше. Тем не менее некоторые факультативные метилотрофы, использующие различные источники углерода, способны синтезировать ЭПС только на средах с метанолом (Hou et al., 1978). У метиловобактерий с РБФ-путем дополнительным субстратом и регулирующим фактором, влияющим на характер превращения углерода метанола, выступает углекислота. Частичная замена метанола бикарбонатом существенно снижала синтез ЭПС (Троценко и др., 2005).

Облигатный метилотроф *Methylobacillus methylophilus* ВСБ-792 способен синтезировать из метанола линейный полимер с α, β -1 \rightarrow 3-связями между входящими в его состав остатками D-глюкозы, D-маннозы, D-галактозы, L-рамнозы и D-глюкуроновой кислоты (Диканская и др., 1987). *Ps. viscogena* TS1004 на среде с 1,5 % метанола синтезировал с 30 %-ным выходом по субстрату кислый ЭПС с молекулярной массой 10^4 - 10^7 , состоящий из остатков галактозы, маннозы, глюкуроновой кислоты, глюкозы и аллозы в соотношении 5,65 : 1,33 : 1,12 : 1,08 : 1,00 (Misaki et al., 1979). Раствор этого ЭПС в присутствии Ca^{2+} при pH 10 образовывал гель. *Xanthobacter* (ранее *Blastobacter*) *viscosus* 7d синтезировал

ЭПС (0,6 г/л) из остатков рамнозы, галактозы, глюкозы, ксилозы и уроновой кислоты (Логинава, Троценко, 1980). *Hyphomicrobium* sp. JTS-811 синтезировал ЭПС гифомикран из D-глюкозы, D-маннозы, 2-о-метил-D-маннозы и остатков пировиноградной кислоты в соотношении 2 : 1 : 1 : 1 (Kanamaru et al., 1982).

Получаемые ЭПС оценивают по динамической вязкости их 1 %-ных растворов, сравниваемой с эталонной вязкостью 1 %-ного раствора ксантана, измеренной в тех же условиях (20 °C, 60 об/мин – 1000 мПа·с). Вязкость растворов ЭПС метиловобактерий достаточно высока (400-600 мПа·с) и сравнима с таковой ксантана, но ряд полимеров образует и более вязкие растворы. Так, ЭПС *Ps. polysaccharogenes* имеет вязкость 2100 мПа·с, а гифомикран – 1160 мПа·с (Takayama et al., 1978; Kanamaru et al., 1982). Высокая вязкость раствора гифомикрана объясняется тем, что двугранные углы валентных связей остатков глюкозы стремятся к 180 °C, и полисахарид характеризуется удлиненными размерами спирали. Благодаря входящей в состав гифомикрана пировиноградной кислоте, ЭПС приобретал дополнительную жесткость за счет электростатического отталкивания равномерно расположенных одноименных зарядов (Kanamaru et al., 1982).

Таким образом, ЭПС метилотрофов, как и полимеры, полученные на углеводном сырье, обладают высокой вязкостью растворов, способностью к гелеобразованию, псевдопластичностью и тиксотропностью (Hou et al., 1978; Гринберг и др., 1992). При этом непатогенность метилотрофов позволяет применять их ЭПС не только для производства картона и как компоненты буровых растворов для увеличения эффективности нефтедобычи, но и в пищевой промышленности, медицине и сельском хозяйстве. Актуальными оста-

ются выделение и селекция новых штаммов-продуцентов ЭПС на основе метанола.

Продукция гомологичных белков

В качестве продуцентов гомологичных белков среди метилотрофов наиболее активно используются дрожжи. Синтезируемые ими ферменты метаболизма C_1 -соединений и продуцируемой при метилотрофном росте перекиси водорода представляют очевидный интерес для промышленности и биоаналитики. Очищенные препараты *алкогольоксидаз* (АО, КФ 1.1.3.13) из *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha* и *C. boidinii*, а также *формальдегид-* (ФАДГ, КФ 1.2.1.46) и *формиаатдегидрогеназы* (ФДГ, КФ 1.2.1.2) из *C. boidinii* коммерциализованы компанией Sigma-Aldrich Inc.

Прикладное значение АО в значительной степени обусловлено их высокой стабильностью. Эти ферменты используются: а) в качестве генератора H_2O_2 в комплексе с липазами и детергентами; б) для отбеливания тканей; в) в качестве поглотителя O_2 в консервированных продуктах питания для увеличения срока их хранения; г) как катализатор в производстве альдегидов из спиртов; д) как компонент биофильтров для очистки загрязненной воды (Sakai et al., 1999). Активный центр АО метилотрофных дрожжей обладает хиральными свойствами, что проявляется в активности фермента с рацемической смесью 2-метил-1-бутанола: (D)-2-метил-1-бутанол окисляется, тогда как (L)-2-метил-1-бутанол остается в реакционной смеси в исходном виде (Clark et al., 1995). Таким образом, биокаталитическая технология, основанная на АО метилотрофных дрожжей, предпочтительна для окисления отдельных энантимеров в рацематах спиртов по сравнению с химическими методами, требующими трудоемкой и

дорогостоящей хроматографической очистки продуктов.

Поскольку при окислении метанола в клетках метилотрофных дрожжей образуется весьма токсичный интермедиат – перекись водорода, у этих микроорганизмов особенно активны антиоксидантные ферменты, служащие для защиты от активных форм кислорода, – *каталазы* (КФ 1.11.1.6) и *супероксиддисмутазы* (СОД, КФ 1.15.1.1). В этой связи неконвенционные дрожжи могут служить источниками этих ферментов (Троценко, Торгонская, 2011). Каталазы и СОД активно используются в пищевой промышленности, косметологии и медицине. Субстратная специфичность каталаз невелика, поэтому они могут катализировать не только разложение H_2O_2 , но и окисление низших спиртов, а также, действуя по пероксидазному типу, способны окислять C_1 -метаболиты.

Ферменты метиловых бактерий с высокими активностями нашли применение в исследованиях, медицине и аналитике. Из метиловых бактерий были получены препараты *глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы* (250 Е/мг белка), *НАДФ⁺-глутаматдегидрогеназы* (180 Е/мг белка), *НАД⁺-малатдегидрогеназы* (300 Е/мг белка), *НАД⁺-формальдегиддегидрогеназы* и *формиаатдегидрогеназы* (Porov, Lamzin, 1994; Tishkov et al., 1999).

Экстремофильные/толерантные метилотрофы реализуют уникальные или общие для бактерий стратегии адаптации к высоким или низким значениям солености, рН, температуры и служат как источниками новых полезных метаболитов, белков и процессов на основе метана и метанола, так и продуцентами *экстремозимов* – ферментов, стабильных в широком диапазоне физико-химических условий. Например, термотолерантные дрожжи *H. polymorpha* и термофильные/толерантные метанотрофы являются источником ряда

ферментов с оптимумами активности в диапазоне 45-70 °С. Такие ферменты могут быть полезны для биотехнологии, в частности, для пищевой и бумажной промышленности, оргсинтеза и кожевенной отрасли, а также в биоаналитике и для биоремедиации загрязненных экосистем.

Биосинтез рекомбинантных белков и системы гетерологичной экспрессии

До 1970-х гг. для экспрессии гетерологичных белков использовали преимущественно системы *E. coli*, «пекарские» дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* или клеточные линии млекопитающих. Недавнее открытие уникальной организации и регуляции метаболизма метилотрофных дрожжей *P. pastoris*, *Pichia methanolica*, *H. polymorpha* и *C. boidinii* (наличие сильных промоторов, индуцируемых метанолом, и четкой компартментации метаболизма) привело к их активному использованию в качестве хозяев для получения рекомбинантных белков и пептидов (Cregg et al., 2000; Macauley-Patrick et al., 2005). Подобно *S. cerevisiae*, метилотрофные дрожжи сочетают преимущества простоты выращивания на недорогой ростовой среде, хорошо известные методы генетических манипуляций и позитивный опыт масштабного культивирования со способностью осуществлять посттрансляционные модификации белков, такие как типичный эукариотический процессинг и гликозилирование. Указанные виды дрожжей имеют большое значение для синтеза фармацевтических белков, поскольку их продукты свободны от эндотоксинов, а также от онкогенной и вирусной ДНК.

В настоящее время продукция высококачественных рекомбинантных белков является одной из основных сфер использования метилотрофных дрожжей в биотехнологии.

Первый патент на технологию экспрессии с использованием *P. pastoris* был получен компанией Phillips Petroleum. С тех пор благодаря интенсивным исследованиям экспрессионные системы метилотрофных дрожжей были существенно оптимизированы, а спектр синтезируемых рекомбинантных продуктов расширен от «технических» ферментов и антикоагулянтов (гирудин и саратин) до фармацевтиков (вакцина гепатита В) (Троценко, Торгонская, 2011).

Метилотрофные дрожжи обладают несколькими важными преимуществами по сравнению с *S. cerevisiae*. Они принадлежат к группе Крэбтри-негативных дрожжей, у которых образование этанола в полностью аэробных условиях происходит на очень низком уровне, что позволяет культивировать их в биореакторе до очень высоких плотностей клеток и способствует высокому выходу целевого продукта. Метилотрофные дрожжи *P. pastoris* и *H. polymorpha* обладают высокой секреторирующей способностью по отношению к высокомолекулярным белкам, что в комбинации с хорошо изученными методами ферментации при высокой плотности клеток приводит к получению гетерологичных белков на уровнях нескольких г/л (Hartner, Glieder, 2006). На основе метилотрофных дрожжей сконструированы «гуманизированные» штаммы, способные гликозилировать рекомбинантные белки по человеческому типу, что особенно важно для продукции биофармацевтиков (Oh et al., 2008).

Широкое использование *P. pastoris* как одной из наиболее популярных платформ (экспрессировано ~1000 белков) объясняется относительной простотой методов молекулярно-генетических манипуляций и условий культивирования, высокими уровнями экспрессии белков, способностью осуществлять эукариотические модификации

белков, выгодным секреторным потенциалом, а также доступностью в форме коммерческого набора (Cregg et al., 2000). Экспрессионная система *P. pastoris* коммерциализована для исследовательских, научных и промышленных целей компаниями Invitrogen и Petroleum совместно с Salk Institute Biotechnology / Industrial Associates Inc. (SIBIA) и используется для программ структурных исследований геномов (Macauley-Patrick et al., 2005; Cos et al., 2006). Система *P. methanolica* для экспрессии гетерологичных белков относительно нова и не столь хорошо охарактеризована, как рассмотренная выше система *P. pastoris*, однако тоже весьма популярна и используется в коммерческом наборе «*Pichia methanolica* Expression Kit».

Еще одной известной метилотрофной системой для гетерологичной экспрессии являются термотолерантные дрожжи *H. polymorpha* (*Pichia angusta*). Это один из наиболее часто используемых объектов современной генетики, для которого получены представительные коллекции штаммов с охарактеризованными мутациями по различным генам. Однако создание рекомбинантных штаммов *H. polymorpha* весьма трудоемко и требует специальных подходов (Gellissen et al., 2005). Подходящей системой для продукции гетерологичных белков может служить и *C. boidinii*, но из-за отсутствия полового цикла их генетический анализ ранее был невозможен. Лишь недавно разработана методология генетических манипуляций для этого вида дрожжей. От других дрожжей *C. boidinii* отличается массивная пролиферация пероксисом и относительная простота получения их высокоочищенной фракции при росте не только на метаноле, но и на олеате или D-аланине (Sulter et al., 1990).

При разработке гетерологичных систем экспрессии для *P. pastoris*, *P. methanolica*,

H. polymorpha и *C. boidinii* изначально использовали их уникально сильные и четко регулируемые промоторы генов ферментов метаболизма метанола: АО (*PpAOX1*, *PmMOD1*, *HpMOX* и *CbAOD1*), ФАДГ (*PpFLD1*, *HpFLD1*, *CbFLD1*), ФДГ (*HpFMD*, *CbFDH1*), S-формилглутатионгидролаз (СФГГ) (*CbFGH1*) и диоксиацетонсинтаз (ДОАС) (*HpDAS*, *CbDAS*) (Sakai et al., 1999; Cregg et al., 2000; Gellissen et al., 2005).

У разных хозяев эти гены подвержены различным типам регуляции, среди которых, кроме индукции метанолом, существуют варианты с индукцией источниками азота (метиламин, холин) и глюкозной репрессией/дерепрессией (Cregg et al., 2000; Gellissen et al., 2005; Yurimoto et al., 2011). Например, для максимальной экспрессии генов с промоторов *AOD1* и *DAS* *C. boidinii* требуется двухэтапная активация путем глюкозной дерепрессии и индукции метанолом как источником углерода или метиламином как источником азота (Sakai et al., 1999; Yurimoto et al., 2011). Особенностью *P. pastoris* и *P. methanolica* является наличие двух генов АО – *PpAOX1/AOX2* и *PmMOD1/MOD2* (*AUG1/AUG2*). Промоторы *P_{MOD1}* и *P_{MOD2}* *P. methanolica* различаются чувствительностью к метанолу и реакцией на уровни глицерина и кислорода, поэтому могут оказаться полезными для дифференцированного контроля фаз продукции двух гетерологичных белков в одной культуре (Nakagawa et al., 2006).

Основным недостатком экспрессионных платформ, основанных на метанол-индуцируемых промоторах, признана строгая зависимость уровня индукции от этого токсичного и потенциально огнеопасного источника углерода, несовместимого с производством пищевых продуктов и добавок (Macauley-Patrick et al., 2005). Повышенная потребность в кислороде и охлаждении фер-

ментационных установок при росте культуры на метаноле увеличивает производственные затраты, а некоторые продукты метаболизма (формальдегид (ФА) и H_2O_2) ускоряют нежелательную деградацию рекомбинантных белков (Gellissen et al., 2005; Cos et al., 2006). Поэтому для обхода использования метанола активно разрабатывают системы экспрессии под контролем альтернативных регулируемых и конститутивных промоторов.

Примерами таких промоторов у *P. pastoris* и *H. polymorpha* являются промоторы генов глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*PpGAP*, *HpGAP*), изоцитратлиазы (*PpICLI*), пероксисомного матриксного белка, существенного для биогенеза пероксисом (*PpPEX8*), генов актина (*HpACT*), H^+ -АТФазы плазматической мембраны (*HpPMA1*), трегалозо-6-фосфатсинтазы (*HpTPSI*), 3-фосфоглицераткиназы (*PpPGKI*), ГТФазы, участвующей в секреции (*PpYPTI*), и фактора элонгации трансляции (*PpTEF* либо *AaTEF1* из *Arxula adenivorans* в *H. polymorpha*) (Gellissen et al., 2005; Cos et al., 2006). Так, терморегулируемый промотор *P_{TPSI}* перспективен для продукции целевого белка при повышенных температурах у термотолеранта *H. polymorpha* (Gellissen et al., 2005). Реже используются индуцируемые нитратом и репрессируемые аммонием промоторы генов транспортера нитритов (*HpYNTI*), нитритредуктазы (*HpYNI*) и нитратредуктазы (*HpYNR1*), репрессируемый фосфатом промотор гена кислой фосфатазы (*HpPHOI*), а также индуцируемый мальтозой и репрессируемый глюкозой промотор гена α -глюкозидазы (*HpMAL1*) (Gellissen et al., 2005). Указанные промоторы оказались привлекательной альтернативой для контроля гетерологичной экспрессии, поскольку демонстрировали при «неметанольной» ферментации близкие уровни экспрессии с промоторами АО (Gellissen et al., 2005; Cos et al.,

2006). Однако выбор оптимальных стратегий ферментации для продукции гетерологичных белков под этими промоторами находится в начальной стадии. Исследования молекулярных основ метилотрофии дрожжей, сфокусированные на транскрипционном аппарате и путях передачи сигналов, участвующих в метанол-индуцируемой экспрессии генов, а также механизмах регуляции гомеостаза и редокс-состояния пероксисом, будут способствовать дальнейшей оптимизации систем гетерологичной экспрессии генов на их основе (Yurimoto et al., 2011).

Недавно появились первые удачные примеры рекомбинантной экспрессии белков у метилобактерий *M. extorquens* (Троценко и др., 2010). На их основе были получены такие продукты, как *транс*-зеатин, энтероцин П, ациламидгидролаза, галоалкандегалогеназа и эстераза. Успешной ферментацией *M. extorquens* ATCC 55366 при высокой плотности клеток доказана эффективность этой системы экспрессии для получения модельного рекомбинантного зеленого флуоресцирующего белка (GFP) (Bélangier et al., 2004).

Биосинтез антибиотиков

Использование метилотрофных дрожжей в качестве платформ экспрессии рекомбинантных белков стимулировало исследования возможности реконструкции путей синтеза полезных соединений у этих эукариот. Недавно появилось первое сообщение о применении для синтеза *пенициллина* рекомбинантов *H. polymorpha*, экспрессирующих гены ферментов биосинтеза этого антибиотика из известного суперпродуцента *Penicillium chrysogenum* и *Bacillus subtilis*. Полученные метилотрофные продуценты оказались перспективными для промышленного получения антибиотика, поскольку секретируют биоактивный пенициллин на уровне (~1 мг/л),

аналогичном *P. chrysogenum*, сложному для крупномасштабного культивирования (Gidijala et al., 2009).

Синтез биопротекторов

Экстремофильные/толерантные аэробные метилотрофы, способные благодаря уникальным экофизиологическим и цитобиохимическим особенностям населять гиперсоленые и щелочные водоемы, горячие источники, водоносные слои глубинных залежей гранитов и многолетнемерзлые грунты, могут служить источниками получения не только экстремозимов, но и биопротекторов, стабилизирующих биомолекулы и целые клетки в неблагоприятных условиях (Безбородов и др., 2008; Троценко, Хмеленина, 2008).

Адаптируясь к высокой солености, галофильные и галотолерантные метилотрофы накапливают осмопротекторы, среди которых наиболее интересны для практического использования *эктоины*. Эктоин (1,4,5,6-тетрагидро-2-метил-4-пиримидин карбоксиловая кислота) и гидроксизэктоин являются распространенными биопротекторами микробного мира. Связывая воду, эти небольшие биосовместимые цвиттерионные амфотерные иминокислоты служат для выравнивания осмотического давления цитоплазмы/внешней среды и защиты компонентов клеток от дегидратации, вызываемой высокими температурами, солями и другими условиями, приводящими к низкой активности воды. Они также препятствуют потере воды, вызываемой сурфактантами (Graf et al., 2008). Предполагается, что эктоины непосредственно не взаимодействуют с белками и не влияют на активность ферментов, но при дегидратации минимизируют их денатурацию путем удержания поверхностной воды и снижения термодинамической выгоды разворачивания трехмерных структур (Goeller, Galinski, 1999).

Универсальные защитные свойства эктоинов обуславливают их использование в медицине (потенциальные лекарства в терапии диабета и болезни Альцгеймера), косметологии (увлажнители, УФ-фильтры в составе косметических средств), научной практике и других смежных областях (биопротекторы при криоконсервации генетического материала, лиофилизации клеток, биохимических исследованиях). Однако широкое применение эктоинов сдерживается сложностью их химического синтеза, требующего дорогостоящих предшественников (L-аминокислот) и многостадийных методов очистки. Биотехнологический способ получения этих биопротекторов впервые реализован фирмами Biomol и Merck (Германия) с использованием гетеротрофной бактерии *Halomonas elongata* на среде с глюкозой, L-аминокислотами и 12 % NaCl с выходом 2,1 г/л эктоина в сутки (Ogen, 2002). Существенно удешевить производство эктоинов может использование непищевых субстратов (метан, метанол) и продуцентов, не требующих специальных ростовых факторов. Для этого перспективно использование солезависимых метилотрофов, накапливающих до 20 % эктоина при росте на минеральной среде с 6 % NaCl и, таким образом, более продуктивных, чем гетеротрофы, растущие при 12 % NaCl (Khmelena et al., 1999; Троценко, Хмеленина, 2008).

Продуцентами эктоина могут служить метилотрофные бактерии родов *Methylomicrobium* (*Mm. alcaliphilum*, *Mm. buryatense*, *Mm. kenyense*), *Methylobacter* (*Mb. marinus*) и *Methylophaga* (*Mpg. thalassica*, *Mpg. marina*, *Mpg. alcalica*) (Khmelena et al., 1999; Троценко, Хмеленина, 2008; Доронина и др., 2010). Наибольшие выходы биопротектора получены у штаммов *Mm. alcaliphilum* (рис. 3) и *Methylophaga*, что объясняется наличием в кластерах генов биосинтеза эктоина допол-

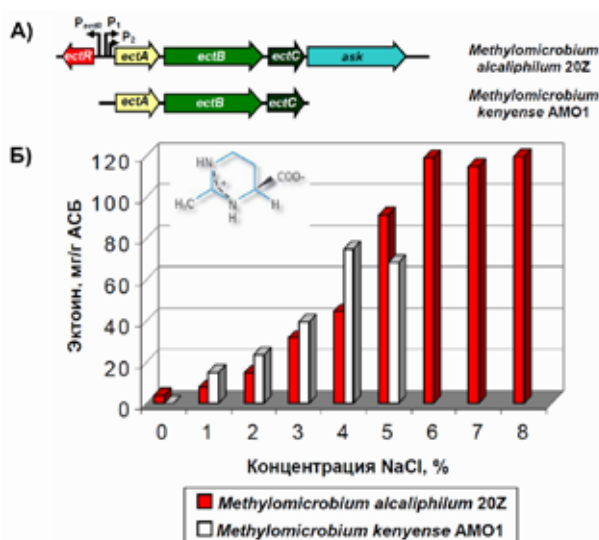


Рис. 3. Структуры кластеров генов биосинтеза эктоина (А) и внутриклеточные уровни эктоина у аэробных метанотрофов в зависимости от концентрации NaCl в среде культивирования (Б). АСБ – абсолютно сухая биомасса, *ectA* – ген диаминобутиратацетилтрансферазы, *ectB* – ген диаминобутираттрансаминазы, *ectC* – ген эктоинсинтазы, *ask* – ген аспараткиназы, *ectR* – ген транскрипционного репрессора EctR

нительного гена аспараткиназы (*ectABCask*). Кодированный *ask* изофермент, по-видимому, обеспечивает относительно независимый от основного конструктивного метаболизма синтез предшественников эктоина – аспартилфосфата и аспартилполуальдегида (Троценко, Хмеленина, 2008). Более высокий внутриклеточный уровень эктоина у метиловых бактерий по сравнению с метанотрофами может быть следствием необходимости у последних дополнительных затрат углерода и энергии на образование поверхностных защитных гликопротеиновых структур (S-слоев) и внутрицитоплазматических мембран (Доронина и др., 2010).

Оптимизация условий синтеза эктоина из метанола *Mm. alcaliphilum* 20Z была проведена в 10-литровом ферментере АНКУМ. В режиме хемостата ($d = 0,02 \text{ ч}^{-1}$) при pO_2 25-35 %, солености 9 % NaCl (в/об) и 0,02-0,05 % (об/об) метанола плотность культуры составила 3,5 г/л сухой биомассы, содержание эктоина в биомассе – 9,4 %, выход эктоина – 0,33 г/л.

Более высокую производительность удалось получить при двухстадийном процессе, включающем этап наработки биомассы культуры в среде с 6 % NaCl и стадию накопления продукта в присутствии 9 % NaCl. Специальная предобработка клеток позволила выделять и очищать эктоин без использования колоночной хроматографии. Многостадийная очистка эктоина методом химической экстракции и рекристаллизации приводила к 50 %-ному выходу эктоина (по отношению к теоретическому) с чистотой продукта 90 % или ~70 %-ному выходу при чистоте препарата 60 % (рис. 4).

Для разработки более эффективных способов продукции эктоинов метилотрофами важна расшифровка механизмов регуляции их синтеза и деградации. Обнаружение у *Mm. alcaliphilum* транскрипционного репрессора EctR указывает на возможность интенсифицировать синтез эктоина у этого метанотрофа путем получения *ectR* мутанта с дерепрессией генов *ect*-оперона (Троценко,



Рис. 4. Схема получения эктоина из метанола с использованием метанотрофов и метилобактерий

Хмеленина, 2008). Несмотря на то что у *Mm. alcaliphilum* 20Z за геном аспаргаткиназы присутствует открытая рамка считывания *phy*, кодирующая белок, сходный с эктоин-гидроксилазами некоторых бактерий (48 % идентичности), условия экспрессии *phy* и синтеза гидроксиэктоина не были выявлены (Reshetnikov et al., 2006). Находясь на расстоянии 359 п.н. от гена *ask*, ген гидроксилазы *phy* не транскрибируется в составе *ect*-оперона *Mm. alcaliphilum* 20Z, что может быть следствием отделения его инсерционной мутацией или наличия других механизмов контроля экспрессии. Исследование функциональности и принципов регуляции экспрессии гена *phy* может расширить биотехнологический потенциал *Mm. alcaliphilum* 20Z за счет продукции гидроксиэктоина, обладающего значительно более высокими протекторными свойствами, нежели эктоин.

Наряду с эктоином клетки метилотрофов накапливают *сахарозу* и *глутамат*, также выполняющие осмопротекторные функции. Возможно, pH среды и соотношение C/N вли-

яют на распределение потока углерода на синтез этих осмолитов. Следовательно, изучение влияния температуры, pO₂, pH, источников азота, фосфора и микроэлементов на клетки метилотрофов создает дополнительные возможности повышения производительности процессов биосинтеза осмопротекторов и выхода целевого продукта.

Аэробные метилотрофы также могут служить перспективными продуцентами *антиоксидантных пигментов*. Термофильные метанотрофы рода *Methylocaldum* способны при повышенной температуре синтезировать меланины, розовоокрашенные метилобактерии рода *Methylobacterium* активно образуют каротиноиды, а факультативный метилотроф *Pseudomonas putida* М продуцирует флуоресцирующий пигмент пиовердин (Троценко, Хмеленина, 2008; Троценко и др., 2010). Эти соединения стабилизируют мембраны и белки, защищают клетки от УФ-излучения, сорбируют тяжелые металлы, а для человека и животных являются провитаминами, иммуностимуляторами и адаптогенами. Пигменты

все более активно применяются в медицине, косметологии и сельском хозяйстве.

Синтез каротиноидов у метиловых бактерий происходит из глицеральдегид-3-фосфата по общему для большинства бактерий пути синтеза изопреноидов через мевалонат-независимую продукцию изопентенил- и диметилаллилпирофосфата, затем конденсирующихся с образованием изопреноидных предшественников β -каротина, зеаксантина и астаксантина. Для синтеза розового пигмента *M. extorquens* AM1 необходима фитоендесапураза CrtI (Van Dien et al., 2003). Для интенсификации биотехнологической продукции каротиноидов можно варьировать физико-химические условия (рН, температура, pO_2).

Флуоресцирующий пигмент *Ps. putida* М пиовердин (Pm), помимо диоксихинолинового ядра, включает пептид, состоящий из треонина, серина, лизина, аспарагиновой кислоты и $N\alpha$ -оксиорнитина с молярным соотношением 3 : 2 : 1 : 1 : 1. Хелатирующая активность пиовердина Pm, обусловленная его высоким сродством к Fe^{3+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Sn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , W^{6+} и Mo^{6+} , обеспечивает *Ps. putida* М антимикробную активность в отношении широкого спектра про- и эукариот. Антимикробная и антиоксидантная активность пиовердина Pm и способность *Ps. putida* М стимулировать рост ряда сельскохозяйственных культур послужили основой для создания полифункционального биопрепарата «Бактофил» для защиты овощных культур от грибных и бактериальных заболеваний, а также от нематод (Максимова, 2005).

Биосинтез алифатических и ароматических аминокислот

Особенности C_1 -метаболизма аэробных метилотрофов делают их перспективными продуцентами серина, метионина («сериновые» метиловых бактерий), фенилаланина, трип-

тофана, тирозина и лизина (бактерии с РМФ-циклом).

Важным преимуществом метилотрофных продуцентов *L-серина* является индукция метанолом серинтрансоксиметилазы (СТОМ), катализирующей конденсацию C_1 -единицы и глицина, хотя у метиловых бактерий с сериновым путем (*M. extorquens* AM1, *Methylobacterium organophilum*) обнаружен и конститутивный изофермент СТОМ. Поскольку L-серин не синтезируется из сукцината или пирувата, синтез этой аминокислоты у метилотрофов непосредственно связан с ассимиляцией углерода метанола (Троценко и др., 2010).

Природные микроорганизмы вследствие функционирования регуляторных механизмов, как правило, не способны к сверхсинтезу клеточных метаболитов, поэтому эффективная продукция аминокислот возможна только при снижении активности систем их разложения в клетках. Так, отмеченный для *Pseudomonas* sp. Zab максимальный выход L-серина (4,7 г/л) из 20 г/л глицина и 8 г/л метанола при повышении рН культуральной среды до 8,5 объясняли снижением деградации L-серина и глицина в щелочных условиях. Повышенной продуктивности *Pseudomonas* sp. MS31, синтезировавшего 2,5 г/л L-серина при добавлении глицина и метанола к культуре, выращенной на метаноле, удалось добиться ингибированием деградации аминокислоты путем добавления в культуральную среду хелатных агентов, Co^{2+} и Ni^{2+} . Термочувствительный мутант ts162, не способный расти на метаноле при температуре выше 37 °С и дефектный по деградации L-серина, синтезировал 6,8 г/л L-серина из глицина (12 г/л) и метанола.

Поскольку активность СТОМ регулируется ретроингибированием и репрессией (например, глицином у *M. organophilum*), получение на основе штамма ts162 мутанта S395,

резистентного к о-метил-DL-серину, позволило достичь продукции 12 г/л L-серина из 15 г/л глицина и метанола. Молярный уровень конверсии добавленного глицина в серин достигал 57 % и значительно превышал показатели для гетеротрофных продуцентов. Возможность полного превращения у метиловых бактерий глицина в серин (необходимая для синтеза C₁-единица образуется из метанола), отличающая их от гетеротрофов, у которых такая конверсия достигает лишь 50 % (C₁-единица образуется путем расщепления глицина), делает перспективной дальнейшую работу по получению метилотрофных продуцентов L-серина. Так, скрининг мутантов с высокой активностью метанолдегидрогеназы (МДГ) и СТОМ позволил отобрать штамм *Hyphomicrobium methylovorum*, иммобилизованные клетки которого синтезировали до 55 г/л L-серина (Izumi et al., 1993).

Показано, что «сериновые» метиловых бактерии перспективны для получения L-метионина, рацемат которого промышленно производят из акролеина и метилмеркаптана (Троценко и др., 2010). Этот важный источник серы и метильных групп для метаболических процессов микроорганизмы синтезируют в сложных и разветвленных метаболических путях, интермедиатами которых являются L-гомосерин, сульфид, S-метил-ТГФ и, возможно, серин, а конечным этапом – трансметилирование L-гомоцистеина. Этионин-резистентный метилотрофный мутант FM518, реализующий изоцитратлиазо-негативный сериновый путь, накапливал в среде с метанолом 0,8 г/л L-метионина.

Активные продуценты ароматических аминокислот (L-фенилаланина, L-тирозина и L-триптофана) – метиловых бактерии с РМФ-путем, образующие из метанола сахарофосфаты, являющиеся интермедиатами их биосинтеза. Метиловых бактерии

синтезируют ароматические аминокислоты по разветвленному пути, инициируемому конденсацией фосфоенолпирувата (ФЕП) с эритрозо-4-фосфатом, катализируемой 3-дезоксид-D-арабиногептулозонат-7-фосфат (ДАГФ) синтазой. Первые семь этапов завершаются синтезом хоризмата – общего предшественника триптофана, фенилаланина и тирозина.

ДАГФ-синтаза у ряда метиловых бактерий представлена тремя (*Methylobacillus mucogenes* M75, *Methylobacillus flagellatus* КТ и *Methylopila capsulata* ИМ1) или двумя изоформами (*Methylobacterium methylica* 2 или *Pseudomonas putida* М) и регулируется на транскрипционном уровне: у *Mb. flagellatus* КТ – триптофаном и тирозином, у *Mp. capsulata* ИМ1 – триптофаном, а у *Ps. putida* М – фенилаланином и тирозином. При этом число *aro*-генов не соответствует количеству обнаруженных апорепрессоров: у *Mb. flagellatus* КТ из трех *aro*-генов репрессии подвержены *aroH* и *aroF*, у *Mp. capsulata* ИМ1 – только *aroH*, а у *Ps. putida* М – репрессирована *aroF*. У некоторых метиловых бактерий с РМФ-путем активность ДАГФ-синтаз также может зависеть от концентрации метанола в среде культивирования (Максимова, 2005).

Пути биосинтеза ароматических кислот детально исследованы у метилотрофного актиномицета *Amycolatopsis methanolica*, на основе которого сконструированы мутанты со сверхпродукцией L-фенилаланина (De Boer et al., 1990). Для биотехнологического синтеза L-триптофана из метанола пригоден *Ps. putida* M35 (630 мг/л), а для получения этой аминокислоты из индола и серина – продуцент триптофансинтазы (200 нмоль/мин × мг белка) *Ps. putida* M15. *Mb. flagellatus* КТ, у которого в условиях дерепрессии активность ДАГФ-синтазы двадцатикратно превышала

такую других бактерий дикого типа, он также перспективен для создания продуцентов ароматических аминокислот (Максимова, 2005).

Метилотрофные продуценты аминокислот можно получать и путем гетерологичной экспрессии генов соответствующих путей биосинтеза. Мы уже упоминали о гетерологичной экспрессии гена бычьей лактатдегидрогеназы, позволившей получить на основе *C. boidinii* наиболее эффективный дрожжевой продуцент L-лактата (до 1,79 г/л ч⁻¹) (Osawa et al., 2009). Для повышенного выхода L-лизина получены также рекомбинанты *Methylophilus methylotrophus*, экспрессирующие резистентные к ретроингибированию ферменты из *E. coli* и/или аминокислотный экспортер из *Corynebacterium glutamicum* (Tsujimoto et al., 2006). Поддержание низкой ионной силы среды при периодическом культивировании *Mph. methylotrophus* увеличивало выход L-лизина (Ishikawa et al., 2008).

Продукция витаминов и кофакторов

Аэробные метилотрофы активно используются для получения флавиновых, хиноновых и тиоловых кофакторов, витаминов, компонентов электронтранспортных цепей (убихиноны, цитохром *c*) и макроэргических соединений (АТФ, АМФ).

Процесс производства *флавинаденидинуклеотида* (ФАД) метилотрофными дрожжами основан на высоком внутриклеточном содержании флавинов, обусловленном уникальными свойствами АО, которая требует присутствия 8 молекул ФАД на каждую молекулу октамера. При росте *C. boidinii* на метаноле активность ФМН-аденилилтрансферазы и продукция ФАД были выше, чем на глюкозе, этаноле или глицерине, поэтому процесс можно стимулировать метанолом. Конверсия

рибофлавина (В₂) или флавинаденинмононуклеотида (ФМН) в ФАД культурой дрожжей на среде с метанолом достигала 45,4 мг/л (Trotsenko, Bystrykh, 1990).

Метилотрофные дрожжи служат отличными продуцентами *глутатиона* (γ -глутамил-L-цистеинил-глицина) – тиолового кофактора, играющего важную роль в детоксикации ключевых интермедиатов метаболизма метанола (ФА и H₂O₂) и накапливающегося при росте на этом соединении (Ubiyovk et al., 2011). Окисленная и восстановленная формы глутатиона (GSH/GSSG) обладают антиоксидантной, детоксицирующей и криопротекторной активностью, являются иммуномодуляторами и стимуляторами регенерации клеток, широко используются в медицине, косметологии и пищевой промышленности. Однако применение глутатиона ограничивается дороговизной и неэффективностью его химического производства.

У *H. polymorpha* идентифицированы гены/ферменты гомеостаза этого кофактора – γ -глутамилцистеинсинтетаза *HpGSH2*, γ -глутамилтранспептидаза *HpGGT1* и глобальный регулятор метаболизма серы *HpMET4* (Ubiyovk et al., 2011). Рекомбинанты *H. polymorpha* DL-1 со сверхэкспрессией генов *GSH2* и *MET4* накапливали внутриклеточный глутатион в количествах 1300-2260 мг/л при росте на глюкозе и 1050 мг/л – на метаноле (Bachhawat et al., 2009). При этом культивирование на метаноле штамма со сверхэкспрессией *HpGSH2* под промотором *P_{МОХ}* приводило к накоплению до 2300 мг/л внутриклеточного и 250 мг/л внеклеточного глутатиона. Таким образом, *H. polymorpha* оказался более эффективным продуцентом глутатиона, нежели *S. cerevisiae*, не дававший таких выходов кофактора даже при добавлении в среду культивирования экзогенных аминокислот (Ubiyovk et al., 2011).

Для получения *пирролохинолинхинона*, обладающего антиоксидантными свойствами и положительно влияющего на рост и иммунную систему человека, логично использовать биомассу метанотрофов и метиловых бактерий, у которых это соединение является кофактором важнейшего для роста на метаноле фермента – МДГ.

Метилотрофы могут служить продуцентами *витамина В₁₂* (кобаламина), участвующего в этил- и метилмалонил-КоА-изомеразной и мутазной реакциях ислл варианта серинового пути, а также в первичном катаболизме хлорметана у *Methylobacterium chloromethanicum* корриноид-содержащими метилтрансферазами. Показано, что, за исключением умеренно галофильных видов рода *Methylophaga*, практически все метиловых бактерии образуют витамин В₁₂ (30-150 мкг/г сухой биомассы), причем наиболее высокое его содержание отмечалось у розовоокрашенных представителей рода *Methylobacterium* (до 850 мкг/г сухой биомассы). Наибольший выход кобаламина отмечался при метилотрофном росте. Например, *Methylobacterium dichloromethanicum* DM4 образует В₁₂ 10 мкг/г сухой биомассы при росте на метаноле или дихлорметане, а на средах с этанолом и сукцинатом – на 30 % меньше (Иванова и др., 2006; Троценко и др., 2010).

В число продуктов, производимых метилотрофами, входят *убихиноны* (коэнзимы Q) – жирорастворимые компоненты дыхательной цепи, участвующие в переносе водорода и электронов на цитохромы и применяемые в медицине и косметологии благодаря антиоксидантным свойствам (коэнзим Q₁₀). Фирмой Mitsubishi (Япония) достигнуты высокие выходы коэнзима Q₁₀ при культивировании факультативных метиловых бактерий на средах с метанолом или глюкозой (10-15 мг/г сухих клеток и 280 мг/л). Получены мутанты, способные продуцировать значительное количе-

ство гомологов убихинона, Q₁₁, Q₁₂ и Q₁₃ (Tani, 1991). На основе производственных штаммов *Ms. capsulatus* Bath и *Methylomonas* sp. 16A предложен способ синтеза наиболее эффективной восстановленной формы метанотрофных убихинонов (Q₈) для улучшения качества и сохранности кормов путем стабилизации их компонентов (липиды, жиры, масла и пигменты). При этом окисленные убихиноны (2500 г/кг) в биомассе восстанавливали обработкой в атмосфере азота или СО₂ и выделяли в бескислородных условиях (Odom, 2006).

Метилотрофы рассматриваются также как потенциальные продуценты *цитохрома с* – компонента цепи переноса электронов, непосредственно сопряженного с ферментами С₁-окисления и применяемого в медицине для лечения болезней, вызванных кислородной недостаточностью. Внутриклеточный уровень этого цитохрома у метиловых бактерий достаточно высок (до 100 мг/л), он локализован в периплазме, либо слабо прикреплен к периплазматической мембране (Tani, 1991).

На основе метилотрофных дрожжей *S. boidinii* путем гетерологичной экспрессии аденозинкиназы из *S. cerevisiae* под промотором АО получен суперпродуцент *аденозинмонофосфата* (АМФ) с тридцатикратно увеличенным выходом (Sakai et al., 1999).

Для синтеза *аденозинтрифосфата* (АТФ) из АМФ и восстановленных С₁-соединений используют содержащие интактные митохондрии и цитоплазматические белки протопласты метилотрофных дрожжей *S. boidinii*, полученные путем обработки клеток зимолиазой. При этом синтез АТФ на смеси, содержащей АМФ, метанол или формиат, НАД⁺ и неорганический фосфор, происходит в результате последовательных реакций фосфорилирования АМФ до аденозиндифосфата (АДФ) аденилаткиназой, окисления метанола/формиата для восстановления НАД⁺ и

окислительного фосфорилирования АДФ до АТФ в дыхательной цепи. АТФ для аденилаткиназной реакции сначала поставляется из эндогенного пула протопласта, а в дальнейшем – из вновь образованного пула АТФ. При использовании метанола и формиата в качестве субстратов в оптимальных условиях получали 13 г/л и 4 г/л АТФ, соответственно. Дополнительная обработка клеток сорбитом позволяла повысить выход АТФ до 30 г/л, способствуя сохранению активности ферментов при увеличении концентрации метанола до 3М или длительности инкубации до 36 ч. Использование при получении АТФ более дешевых субстратов (аденозина или аденина) значительно повышали соотношение практической и теоретической эффективности процесса по выходу АТФ (100 г/л) и конверсии аденозина (77 %) (Tani, 1991). Гетерологичной экспрессией в *C. boidinii* аденилаткиназы из *S. cerevisiae* под контролем промотора P_{AOD1} удалось в 10 000 раз увеличить активность этого фермента и достичь в 23 раза больших уровней продукции АТФ по сравнению с диким штаммом. В ферментации с контролем рН и подпиткой аденозином за 45 ч получали до 117 г/л АТФ при 78 %-ной конверсии (Sakai et al., 1999).

Продукция полупроницаемых мембран для нанотехнологии и биомедицины

Интересным и биотехнологически перспективным свойством экстремофильных метанотрофов является образование на поверхности клеток защитных гликопротеиновых структур (S-слоев), расположенных в $p2$, $p6$ или $p4$ симметрии. Для S-слоев характерны регулярность размеров, морфологии пор, определенное положение и ориентация функциональных связей на белковой решетке, что делает весьма перспективным

применение этих структур в качестве иммобилизационных матриксов для биоактивных макромолекул (ферментов, антител) в технологиях биосенсоров, иммунодиагностике и разработке вакцин. Кроме того, S-слои можно использовать в хроматографических системах как афинные носители. Способность белковых компонентов S-слоев к самосборке и их сшивка на мембранах *in vitro* позволяет получать полупроницаемые мембраны, размеры пор которых соответствуют таковым продуктов самосборки. Наличие у представителей *Methylomicrobium*, *Methylococcus* и *Methylocaldum* S-слоев, а также способность расти с высокой скоростью на метане или метаноле в широком диапазоне рН и солёности дают основание считать их потенциальными продуцентами этих ценных биоструктур (Троценко, Хмеленина, 2008).

Аэробные метилотрофы как биокаталитические агенты

Как известно, метанмонооксигеназы метанотрофов обладают широкой субстратной специфичностью и способны моногидроксилировать различные соединения. Наиболее ценной реакцией биотрансформации, катализируемой ММО, является образование из соответствующих алкенов эпоксисоединений, представляющих большой коммерческий интерес вследствие способности к полимеризации, образованию моно- и сополимеров новых классов пластмасс. Существующие химические процессы получения эпоксидов многостадийны, энергозатратны и сопряжены с образованием побочных продуктов, что делает их менее выгодными, нежели получение с помощью растущих клеток метанотрофов, выделяющих эпоксиды в среду культивирования.

Однако очевидной проблемой при конверсии пропилена в эпоксипропан клетками

Ms. capsulatus Bath стало ингибирование продуктом активности ММО. Этот эффект можно преодолеть, используя дополнительный ферментер для периодической регенерации инактивированных клеток ростовым субстратом, но для уравнивания скоростей синтеза и реактивации объем ферментера-реактиватора должен быть в 20 раз больше, нежели объем биореактора, и цена получаемого эпоксипропана (30000 т/год) становится слишком высокой. Экономически выгодным этот процесс может стать при увеличении стоимости продукта, например, при образовании одного энантиомера эпоксипропана вместо рацемата, что может использоваться в фармацевтике (Dalton, 1985).

Другим типом коммерчески привлекательных реакций, катализируемых ММО, является синтез первичных и вторичных спиртов при окислении соответствующих углеводов (Dalton, 1985; Безбородов и др., 2008).

Получение ^{13}C -сахарофосфатов для экспериментов с применением ядерного магнитного резонанса (ЯМР) путем химического синтеза также менее предпочтительно по сравнению с использованием биокатализаторов вследствие оптической специфичности реакций, низкого выхода меченых сахаров и сложных процессов разделения. Перспективными биокатализаторами для синтеза ^{13}C -меченых сахарофосфатов, последовательно трансформируемых в различные кетозы и альдозы с помощью химических и биохимических модификаций, признаны ферменты РМФ-пути метилотрофов – гексулозофосфатсинтаза (ГФС) и фосфогексулоизомераза (ФГИ). С использованием ферментной системы, содержавшей ГФС и ФГИ из *Methylobacillus aminofaciens* 77a и фосфоризомеразу шпината, из D-рибозо-5-фосфата и (1- ^{13}C)-формальдегида в качестве доно-

ра ^{13}C специфически синтезировали (1- ^{13}C) D-фруктозо-6-фосфат с конверсией >90 % ФА. (1- ^{13}C)-D-глюкозо-6-фосфат также продуцировался ферментной системой, включавшей ГФС и ФГИ (Yanase et al., 1993).

Метилотрофные дрожжи тоже используются в качестве каталитических агентов, например, для получения пирувата при окислении L-лактата пермеабелизованными клетками рекомбинантов *H. polymorpha* и *P. pastoris*, экспрессирующих эндогенную каталазу и гликолатоксидазу (КФ 1.1.3.15) из шпината. При этом пируват экстрагируют из реакционной смеси с высоким выходом и чистотой путем отделения катализатора и последующей лиофилизации продукта (Eisenberg et al., 1997).

Благодаря метилотрофам, такой важный источник сырья в химической промышленности, как *формальдегид*, тоже оказалось выгоднее синтезировать микробиологической конверсией из метанола, нежели химическим путем. При использовании в реакторах для ферментативного окисления метанола до ФА иммобилизованных АО или клеток *H. polymorpha* скорость конверсии составляла 70 и 60 % при концентрациях метанола 50 и 100 мМ, соответственно. Мутант *Candida* sp. с повышенной активностью АО продуцировал до 0,8 М ФА (Trotsenko, Bystrykh, 1990).

АО метилотрофных дрожжей окисляют и другие спирты в соответствующие альдегиды, например, этанол и аллиловый спирт – до ацетальдегида и акролеина, соответственно. Не содержащий опасных примесей биотехнологический ацетальдегид годен для пищевой промышленности, однако технология его получения с помощью метилотрофных дрожжей оказалась экономически неэффективной из-за ингибирования их роста этанолом. Напротив, в отличие от химического способа получения акролеина с энергоемкими стадиями очистки целевого продукта от значительных коли-

честв ацетальдегида и ацетона, выход акролеина при окислении аллилового спирта АО составлял 98 % (Sakai et al., 1999).

С помощью метилотрофов можно также получать некоторые органические кислоты, кетоны и спирты. Конверсия метанола иммобилизованными клетками метилотрофных дрожжей или их АО, каталазой и ФА-дисмутазой (катализирует дисмутацию альдегидов в соответствующие кислоты и спирты) является потенциально значимым способом получения *формиата* (Троценко, Торгонская, 2011). Продуцентами *лимонной кислоты* могут служить резистентные к фторацетату мутанты *C. boidinii*, образующие при росте на метаноле в присутствии указанного ингибитора до 5 г/л цитрата после 4 суток ферментации. Биотехнологически перспективен способ продукции *этанол* в высокотемпературной алкогольной ферментации ксилозы клетками *H. polymorpha* (Ryabova et al., 2003). Для продукции *диоксиацетона* и *глицерина* из метанола с 20 %-ным выходом использовали клетки мутантов метилотрофных дрожжей, лишенных активности диоксиацетонкиназы (Kato et al., 1986). Другим способом получения глицерина был синтез глицерин-негативными мутантами, экспрессирующими диоксиацетонредуктазу (Tani, 1991).

У метилотрофных дрожжей *P. pastoris*, образующих *перекись водорода* в реакции окисления метанола АО, химическое ингибирование активности каталазы позволило добиться продукции H_2O_2 на уровне 0,22 г/г сухой биомассы $ч^{-1}$ (Zhang, Wang, 1994). Другим способом генерации H_2O_2 , реализованным фирмой Henckel (Германия) в стиральных порошках и в микрохирургии для локальной дезинфекции ран, является использование очищенных препаратов АО метилотрофных дрожжей.

Аэробные метилотрофные бактерии как фитосимбионты

Как известно, растения – глобальный источник атмосферного метанола (100 млн т/год С, 40-46 % общего летучего С атмосферы), выделяемого при деметилировании пектина и деградации лигнина в клеточных стенках, а также широкого спектра других C_1 -соединений, в том числе, вероятно, метана (Hanson, Roje, 2001; Kepler et al., 2006). Это создает предпосылки для постоянной колонизации их ризосферы, филлосферы и семян метилотрофами, использующими синтезируемые C_1 -соединения как источники углерода и энергии для роста. Скрининг 140 видов одно- и двудольных растений выявил повсеместный характер колонизации растений метилотрофными бактериями и их высокую плотность на единицу листовой поверхности (до 600 КОЕ/см²). Это свидетельствует об образовании метилотрофами своеобразного катоболического экрана, препятствующего поступлению в атмосферу летучих C_1 -продуктов метаболизма растений. Однако и растения получают пользу от такого соседства.

Известно, что ряд биоактивных соединений, выделяемых метилотрофными бактериями прижизненно или в результате лизиса клеток, может оказывать благоприятное воздействие на рост и развитие растений. Выделено большое количество метилотрофных фитосимбионтов, обладающих одним или несколькими свойствами, позволяющими в определенных условиях стимулировать рост и развитие растений. Некоторые из этих бактерий влияют на рост растений напрямую, например, продуцируя фитогормоны или потребляя питательные вещества из почвы (азотфиксация), другие – косвенно, путем подавления роста фитопатогенов. В связи с этим локализация не только на поверхности, но и внутри растений, по-видимому, обеспечивает

метилотрофам более активное участие в фитосимбиозе (Иванова и др., 2006; Федоров и др., 2011).

Участие метилотрофных бактерий в развитии одно- и двудольных растений убедительно продемонстрировано в экспериментах с гнотобионтами. Показано, что колонизация гнотобиотических растений *in vitro* метанотрофами (*Methylomonas methanica*, *Methylosinus trichosporium*) и метиловыми бактериями (*Methylovorus mays*) повышала всхожесть семян, скорость роста, фотосинтетическую активность, регенерационный потенциал и способность к корнеобразованию. Все колонизованные растения отличались от контрольных по внешнему виду и даже на средах без витаминов имели ярко-зеленую окраску, большие листья и хорошо развитые корни. У колонизованных метиловыми бактериями растений также повышалась устойчивость к фитопатогену *Erwinia carotovora*, что может быть следствием биосинтеза антибиотиков или ферментов, лизирующих клеточные стенки грибов, связывания железа в ризосфере, индуцированной системной устойчивости растений, а также конкуренции за места связывания на корнях (Троценко и др., 2010; Федоров и др., 2011).

Показано, что инокуляция штаммами *Methylobacterium* усиливала устойчивость арахиса к фитопатогенным грибам *Aspergillus niger* и *Sclerotium rolfsii*, а у растений риса приводила к увеличению активности ферментов, лизирующих клеточные стенки фитопатогенных грибов (*фенилаланин-аммоний-лиазы*, *хитиназы*, *β -1,3-глюканазы*, *пероксидазы*) (Chet, Inbar, 1994). Более того, преинокуляция метиловыми бактериями снижала развитие прикорневой гнили, вызываемой фитопатогенным грибом *Rhizoctonia solani* у растений риса, и на 26 % уменьшала поражение тканей томата фитопатогеном *Pseudomonas syringae* pv.

tomato по сравнению с необработанными контролями (Madhaiyan et al., 2004; Indiragandhi et al., 2008).

Некоторые бактерии подавляют рост грибковых фитопатогенов, синтезируя низкомолекулярные *сидерофоры*, связывающие наибольшее количество доступного железа в ризосфере. Способность к образованию сидерофоров была выявлена у 37 метилотрофных штаммов-эндофитов, идентифицированных как представители видов рода *Methylobacterium*: *M. mesophilicum*, *M. extorquens*, *M. zatmanii*, *M. radiotolerans*, *M. fujisawaense*, однако структура этих соединений пока не определена (Lacava et al., 2008). Облигатный метилотроф *Methylobacillus mucogenes* M75 является природным продуцентом выполняющего функцию сидерофора 2,3-диоксибензоата. Синтез этого соединения контролируется Fe^{2+} -ионами и рядом производных хоризмата (п-аминобензоатом, п-оксибензоатом, антранилоатом) (Максимова, 2005).

В последнее десятилетие установлена новая жизненно важная роль аэробных метилотрофов в качестве фитосимбионтов: при росте на одно- и полиуглеродных субстратах факультативные метилотрофы конститутивно синтезируют фитогормоны *цитоконины* и *ауксины* – биоактивные соединения, оказывающие благоприятное воздействие на рост и развитие растений. Представители всех известных родов метиловых бактерий и многих метанотрофов, выращенные на средах с метаном, метанолом или метиламином в присутствии 5 мМ L-триптофана, синтезировали индольные соединения, в частности гормон роста растений – индолилуксусную кислоту. Ген изопентенилтрансферазы *ipt* – ключевого фермента синтеза цитокининов – выявлен у коллекционных культур метанотрофов (Федоров и др., 2011). Результаты проведенных

биотестов также свидетельствуют о способности метилотрофов синтезировать еще один класс фитогормонов – *гиббереллины*, но пока убедительных экспериментальных доказательств их продукции не получено.

Активные исследования структурно-функциональных основ взаимодействия аэробных метилотрофов с растениями создают методологические основы повышения продуктивности сельскохозяйственных культур. облигатные метилотрофы выгодно отличаются от гетеротрофов непатогенностью и неспособностью расти на средах для культивирования растений *in vitro* из-за множественных энзиматических блоков в центральном метаболизме (ЦТК, гликолиз, глюконеогенез). Это делает их весьма перспективными для разработки новых биотехнологий культивирования трансгенных растений, микроразмножения и регенерации гнодобактериальных растений с последующей адаптацией к условиям открытого грунта. весьма актуальна также возможность использования метанотрофов в замкнутых системах жизнеобеспечения человека (космические оранжереи), основанная на способности не только стимулировать рост и развитие растений и индуцировать их системную устойчивость к фитопатогенам, но и реутилизировать C_1 -соединения техногенного и биогенного происхождения, в том числе метан – продукт анаэробного разложения органических отходов (Троценко, Хмеленина, 2008; Троценко и др., 2010). При этом невесомость и другие условия космического полета на орбитальной станции «САЛЮТ» не влияли на рост, размножение и ультраструктурную организацию метилотрофов (Таирбеков и др., 1985). В связи с вышеизложенным ведется селекция метилотрофных культур с целью создания нового стимулятора роста растений – метилобактерина.

Аэробные метилотрофы как биоаналитические агенты

Активное использование метанола и ФА привело к серьезному вызову – необходимости мониторинга и контроля содержания этих токсичных C_1 -соединений в окружающей среде (например, в промышленной эмиссии газов, сточных водах и воздухе помещений), питьевой воде, разнообразных изделиях, продуктах питания, медицинских препаратах и биологических жидкостях. Благодаря специфике метаболизма, клетки и ферменты метилотрофов активно используются в биоаналитике, являющейся доступной альтернативой дорогостоящим и сложным физико-химическим методам детекции.

АО метилотрофных дрожжей имеют коммерческое применение при измерении концентраций спиртов в биологических и небологических жидкостях, а также исследуются в качестве возможных агентов биоремедиации стоков и испарений метанола и ФА. На основе АО и ФАДГ метилотрофных дрожжей создана технология *ферментного анализа* концентраций спиртов и ФА, результаты которого коррелируют с данными, полученными газовой хроматографией и химическими методами (Gonchar et al., 2001; Sibirny et al., 2011).

Описан метод колориметрического определения содержания спиртов по окислению красителей H_2O_2 , продуцируемой *H. polymorpha* при конверсии аналитов в соответствующие альдегиды с помощью очищенной от каталазы АО (Verduyn et al., 1984). Для получения таких препаратов используют выращенный на глюкозе каталазодефицитный мутант *H. polymorpha* (*gcr1 catX*) с нарушенной глюкозной репрессией синтеза АО (Gonchar et al., 1998). Оксидазо-пероксидазный метод и ферментный набор «Alcotest» для анализа содержания спиртов,

в частности этанола, основаны на измерении накопления окрашенного продукта перекисного окисления хромогена (3,3',5,5'-тетраметилбензидин дигидрохлорида) при катализируемой АО конверсии аналитов. При этом АО может реагировать и с ФА, образуя гемдиол (Gonchar et al., 2001).

Способность АО окислять ФА реализована в ферментно-химическом методе одновременного определения метанола и ФА в смесях с помощью АО *H. polymorpha* и альдегидселективного реагента (3-метил-2-бензотиазолионгидразона), являющемся простой и полезной альтернативой для серийных анализов промстоков и сертификации формалинсодержащих материалов. При этом ФА детектируется колориметрически, так как в присутствии альдегид-селективного реагента образуется азиновый аддукт, предотвращающий дальнейшее ферментативное окисление альдегида, а содержание метанола определяют по возрастанию количества окрашенного продукта при окислении метанола АО (Sibirny et al., 2011).

Для детекции ФА также используют его окисление ФАДГ метилотрофных дрожжей до формиата с одновременным восстановлением НАД⁺ до НАДН₂. Препараты термостабильной НАД⁺- и GSH-зависимой ФАДГ с удельной активностью 17 Ед/мг белка при 25 °С (или 27 Ед/мг белка при 37 °С) из сверхпродуцентов *H. polymorpha* предложены для ферментного анализа содержания ФА путем колориметрической детекции формазана, образуемого синим нитротетразолием в сопряженной с окислением ФА реакции (Sibirny et al., 2011). На основе ФАДГ также разработан чувствительный метод и набор «Formatest», в котором анализ проводится в условиях неполной конверсии ФА (10 %) с использованием лимитирующей концентрации фермента (23 мЕд/мл) в реакционной смеси, что экономично при

высоком содержании ФА в образцах. Преимущество этого метода – простота, быстрота, большая точность и отсутствие потенциально опасного нагревания по сравнению с химическим методом определения с хромотроповой кислотой (Sibirny et al., 2011). Тем не менее применение ФАДГ для анализа содержания ФА ограничивают такие свойства образцов, как присутствие Hg-содержащих консервантов (в некоторых вакцинах), ингибирующих активность фермента (Paryzhak et al., 2007).

Другим типом высокочувствительных и селективных биоаналитических методов с использованием метилотрофов является активно развиваемая технология биосенсоров. Биосенсоры – это гибридные устройства, содержащие биоэлемент (иммобилизованный биоактивный материал) и физический преобразователь (трансдуктор). Степень селективности конкретного биосенсора определяется типом биоэлемента.

Для количественного анализа спиртов были разработаны потенциометрические (на основе pH-чувствительных полевых транзисторов – pH-SFET, pH-Sensitive Field Effect Transistors) и амперометрические (на основе чувствительного к O₂ или H₂O₂ электрода) биосенсоры. Поскольку в сенсорах pH-SFET используют сильное закисление инкубационной среды, вызываемое метаболической конверсией аналитов, в качестве их биоэлементов применяют специально сконструированные мутанты метилотрофов со специфическими дефектами метаболизма, позволяющими более активно продуцировать соответствующие кислоты из определенных субстратов. Биосенсоры, полученные с использованием таких мутантов, проявляют высокую селективность в отношении соответствующих аналитов. Например, дефектный по ФАДГ мутант *H. polymorpha* обеспечивает специфичный ответ биосенсора на присутствие в среде ме-

танолол или ФА, а разрушение гена ацетил-КоА-синтетазы у *P. methanolica*, приводящее к неспособности использовать уксусную кислоту, позволяет применять клетки мутанта для детекции этанола (Gonchar et al., 1998). На основе иммобилизованных клеток штамма *M. dichloromethanicum* DM4, экспрессирующих активную GSH-зависимую дегалогеназу, катализирующую разложение дихлорметана до ФА и HCl, сконструирован потенциометрический высокоспецифичный биосенсор для детекции CH₂Cl₂ (Плеханова и др., 2012). К сожалению, ответ pH-чувствительных биосенсоров крайне зависит от буферных свойств раствора и стабильности их биоэлементов (Gonchar et al., 2002).

В качестве биоэлемента ферментных сенсоров на спирты часто используют очищенные препараты АО метилотрофных дрожжей. Для этой цели они подходят лучше, нежели алкогольдегидрогеназы, поскольку, обладая прочно связанным ФАД, не требуют добавления экзогенных кофакторов и обеспечивают необратимость реакции (Woodward et al., 1990). На основе АО сконструированы алкобиосенсоры для детекции этанола и метанола в крови, биологических жидкостях, спиртных и других напитках, а также в парах выдыхаемого воздуха (Verduyn et al., 1983). Селективность, чувствительность и стабильность таких биосенсоров зависят от качества используемых препаратов АО.

При конструировании амперометрических микробных биосенсоров для детекции метанола и этанола используют способность метилотрофных дрожжей поглощать кислород в процессе окисления субстратов в алкогольоксидазной реакции (Sibirny et al., 2011). Методами генной инженерии можно улучшать их биоэлементы, однако в отношении неспецифичных субстратов клетки могут проявлять неселективный дыхательный от-

вет, поэтому требуется дополнительная обработка пермеабилizующими агентами (дигитонин, цетилтриметиламмоний-бромид) (Gonchar et al., 1998). Кроме методов, основанных на непосредственной электродной детекции перекиси водорода, используют системы разложения H₂O₂ иммобилизованными ферментами антиоксидантной системы. Дизайн таких сенсоров может включать иммобилизацию АО и каталазы (на коммерческом кислородном электроде Кларка) или пероксидазы, разлагающей H₂O₂ в присутствии химических медиаторов (Verduyn et al., 1983; Smutok et al., 2006). Стабильный чувствительный биферментный биосенсор, разработанный на основе высокоочищенного препарата АО, пероксидазы хрена и катодного электродепозиционного красителя, был способен к независимой амперометрической детекции метанола и этанола (Smutok et al., 2006). Биосенсор с АО, иммобилизованной на поверхности платинового электрода, детектировал метанол (до 3,7 мМ), этанол (до 3,0 мМ), н-бутанол (до 6,2 мМ) и бензиловый спирт (до 5,2 мМ) по электроокислению H₂O₂ (Guelce et al., 2002). В системах для независимого хроматоамперометрического определения H₂O₂, метанола, этанола, пропанола, изопропанола и бутанола АО-биосенсор применялся для детекции спиртов после их разделения газовой или высокоэффективной жидкостной хроматографией (Sibirny et al., 2011).

ФА-селективные биосенсоры основаны на клетках или ферментах метилотрофных дрожжей в качестве чувствительных элементов и могут действовать в газах и органической фазе. Аналитическим сигналом потенциометрических биосенсоров для количественного анализа ФА является образование H⁺ при окислении ФА в формиат (Sibirny et al., 2011). В качестве биоэлемента микробного потенциометрического биосенсора на ФА оказался

эффективным мутант *H. polymorpha* с репрессированными активностями АО, ФДГ и блокированной ФА-редуктазой. Такой биосенсор обладал высокой специфичностью к ФА (2-200 мМ) без ответа на глюкозу, глицерин, органические кислоты, метанол и другие спирты, за исключением очень низкой чувствительности к этанолу (Gonchar et al., 2002).

Потенциометрический биосенсор на основе АО метилотрофных дрожжей, неожиданно проявивший селективность к ФА, был улучшен иммобилизацией фермента в гидрофобных акриловых микросферах, что позволило увеличить скорость ответа, снизило предел детекции (0,3-316,2 мМ ФА) и увеличило стабильность биоэлемента (Sibirny et al., 2011). В амперометрических биосенсорах для определения уровня ФА в качестве биоэлементов использовали клетки рекомбинантного продуцента ФАДГ *H. polymorpha* и выделенный из них соответствующий фермент (Hall et al., 1998). Кондуктометрические и емкостные биосенсоры с иммобилизованными ФАДГ или АО и их кофакторами имели наибольшую стабильность биоэлементов, были высокоселективны и специфичны для ФА, но присутствие других соединений (метанол, этанол) вызывало значительные изменения их ответа (Sibirny et al., 2011).

В настоящее время в биоаналитике используется дрожжевая НАД⁺- и GSH-зависимая и бактериальные НАД⁺-зависимая и связанная с красителями ФАДГ (Gonchar et al., 2002). Биоэлементы с ФАДГ более селективны в отношении ФА, нежели таковые с микробными клетками или АО (Gayda et al., 2008). Вместе с тем, амперометрические биосенсоры на основе клеток и ферментов работают при более низком прилагаемом потенциале (0-160 против 340-610 мВ), что позволяет уменьшить возможные помехи от других субстратов (метанол, этанол и ацетат). При тестирова-

нии образцов сточных вод, фармацевтиков и ФА-содержащих промышленных продуктов амперометрические биосенсоры проявили высокую селективность к ФА (100 %) и очень низкую перекрестную реакцию на другие структурно похожие соединения: бутиральдегид (0,93 %), пропиональдегид (1,89 %), ацетальдегид (5,1 %) и метилглиоксаль (9,12 %) (Paryzhak et al., 2007). Амперометрические и емкостные биосенсоры на основе АО, ФАДГ и клеток сверхпродуцента ФАДГ *H. polymorpha* были чувствительны к низким концентрациям ФА (Sibirny et al., 2011).

Активное изучение и разработка систем экспрессии гетерологичных белков у метилотрофных дрожжей способствуют расширению спектра аналитов для биосенсоров, а также появлению новых высокоэффективных генно-инженерных штаммов с повышенной селективностью и активностью конверсии целевых соединений. Так, дрожжевая L-лактат:цитохром *c*-оксидоредуктаза (флавоцитохром *b*₂) перспективна для разработки биоэлементов сенсоров L-лактата и хроматов, а рекомбинантная человеческая аргиназа I, продуцируемая дрожжами, может быть использована для детекции аргинина в человеческой сыворотке с помощью потенциометрического биосенсора с NH₄⁺-селективным электродом (Stasiuk et al., 2010). Для определения содержания аспартама в безалкогольных напитках и подсластителях предложен биферментный биосенсор с АО и карбоксилэстеразой, иммобилизованными на желатиновой мембране в комбинации с O₂-чувствительным электродом (Odac et al., 2004).

Аэробные метилотрофы как агенты биодеградации и биоремедиации

Зачастую мониторинг и контроль уровней токсичных C₁-соединений в окружающей

среде недостаточны и необходимы методы их эффективного удаления, в частности, из стоков и газовых выбросов промышленных предприятий, а также из воздуха помещений. Перспективность использования аэробных метилотрофов для биоремедиации загрязненных экосистем обусловлена их способностью разлагать и/или использовать в качестве источников углерода и энергии широкий спектр высокотоксичных соединений: метанол, формальдегид, метилированные амины, метилсернистые соединения, галометаны, метил- и этилацетат, ацетон и толуол. Ферментные системы метанотрофов, такие как ММО, способны также соокислять широкий спектр алифатических, ароматических и алициклических углеводородов и галогенированных соединений (Higgins et al., 1980).

Микробиологические методы борьбы с метаном в угольных шахтах разрабатываются в России еще с 1930-х гг. Несмотря на широкое распространение в сточных и рудничных водах, метанотрофы практически отсутствуют в каменно-угольных пластах и вмещающих их породах, не контактировавших с рудничной атмосферой (Малашенко и др., 1987). При этом аборигенной микрофлорой окисляется <1 % CH_4 , выделяющегося из угля. Следовательно, для уменьшения содержания метана в угольных шахтах перспективно введение суспензий метанотрофов в угольные пласты, выработанные пространства и другие структуры. Предлагаемые методы дегазации основаны либо на предварительной закачке в угольный пласт суспензии метанотрофов и создании условий для их жизнедеятельности, либо на обработке выработанного пространства суспензией метанотрофов непосредственно в процессе добычи. В результате создается бактериальный фильтр на пути метана, диффундирующего из близлежащих угольных пластов в результате сброса уголь-

ного давления (Мякенький, Курдиш, 1991). Впервые принципиальная возможность применения метанотрофов для снижения газообильности выработанных пространств была реализована ИГТМ АН УССР в 1978 г. на шахте Ясиновская-Глубокая. При этом в периоды микробиологического воздействия газообильность добычных участков снижалась на 40-60 %, что обеспечивало условия безопасного ведения горных работ (Мякенький, Курдиш, 1991). В результате этих исследований были отработаны основные приемы дегазации пластов, транспортировки и хранения метанотрофов, а также способ получения больших объемов высокоактивной суспензии клеток из содержащегося в откачиваемых из угольных пластов газах метана (Мякенький, Курдиш, 1991).

Загрязнение грунтовых вод галогенсодержащими растворителями представляет серьезную проблему для здоровья человека в индустриальных странах. *Галогенированные углеводороды* широко используются в промышленности как растворители, при производстве пластмасс, применяются для обезжиривания металлов, сухой чистки, являются интермедиатами при получении гербицидов и инсектицидов. Они стабильны, токсичны, канцерогенны и доминируют как загрязнители питьевой воды. Модельным соединением при разработке способов биоремедиации с применением микроорганизмов служит трихлорэтилен (ТХЭ), который, будучи неканцерогенным, частично окисляется в организме млекопитающих с участием цитохрома Р-450 до продуктов с мутагенной активностью.

Показано, что смешанные и чистые культуры метанотрофов в условиях биореактора способны разлагать разнообразные галогенированные соединения. Очищенная sММО очень быстро окисляет хлоралкены, включая хлорвинил, ди- и трихлорэтилен. Скорость

окисления *Methylosinus trichosporium* ОВЗб, 150 нмоль/мин мг белка, означает, что суспензия клеток этой бактерии (1 мг/мл) способна удалить 20 мг/л ТХЭ в течение 1 мин. Показано, что ММО окисляет ТХЭ до эпоксида, далее разлагаемого до кислых продуктов (глиоксилата, дихлорацетата и формиата) и летучих соединений (хлоральгидрата и СО) (Little et al., 1988). Это делает метанотрофы привлекательными агентами для биоремедиации хлоралкенов, однако успешным их использование будет лишь при снятии ингибирования ММО и других ферментов начальными продуктами гидроксилирования. Полное разложение ксенобиотиков может быть достигнуто при использовании смешанных культур. Инокулирование метанотрофами колонки с почвой, загрязненной галогенированными углеводородами, и их инкубация в атмосфере природного газа в смеси с воздухом приводили не только к полному исчезновению галометанов, но и к накоплению ПГБ (Nichols, White, 1989).

Впервые создана коллекция деструкторов *галометанов* (моно- и дихлорметана, бромметана), активно используемых для исследования механизмов дегалогенирования (Троценко и др., 2010). Лабораторные биореакторы для разложения бромметана до CO_2 и Br^- на основе клеток *Aminobacter ciceronei* функционировали длительные периоды времени со 100 %-ной эффективностью при контроле температуры и pH (Schaefer et al., 2007). Клетки этих метилобактерий также применяли для окисления бромметана непосредственно на поверхности почв при фумигации полей. Тем не менее непосредственное применение метилобактерий было отложено из-за невозможности контроля факторов, снижающих эффективность метода: локальных концентраций бромметана ($>5\%$), температуры ($>40\text{ }^\circ\text{C}$) и концентраций ингибитора окис-

ления бромметана – хлорпикрина. В связи с этим более перспективен внедряемый компанией Value Recovery Inc. (Нью-Джерси, США) метод сбора бромметана между двумя слоями пластиковой пленки и его транспортировки потоком воздуха в реакционную камеру с очистителем. Перспективность бактериальных деструкторов как агентов биодеградации дихлорметана, разлагающих этот токсикант до CO_2 и HCl , также подтверждена соответствующими исследованиями на биореакторах (Flanagan, 1998).

Культуры метилотрофов могут служить для очистки стоков сульфатцеллюлозного производства от *метанола*. Выделены метилотрофные бактерии-деструкторы *метилацетата*, обладающие карбоксилэстеразой с широкой субстратной специфичностью. Перспективны для биоремедиации промышленно загрязненных почв и стоков *Methylibium petroleiphilum* PM1, *Hydrogenophaga flava* и *Mycobacterium austroafricanum*, способные расти на *метил-третичном бутиловом эфире* – персистентном токсичном соединении, широко применяемом для окисгенирования бензина (Троценко и др., 2005).

Показано, что использование метилотрофов для разложения *формальдегида* более перспективно, нежели физические и химические способы. С этой целью возможно применение биофильтров, содержащих природные метилотрофные дрожжи и бактерии, способные разлагать ФА. Для таких биофильтров со смесью метанола и ФА достигнут максимум разлагающей способности 180 г ФА/м³ ч (3 мкмоль/г ч) (Prado et al., 2006). Недавно для удаления ФА из воздуха помещений предложен эффективный и экологичный способ, основанный на использовании иммобилизованной АО *H. polymorpha* в проточном биореакторе. После окончания процесса содержимое такого биореактора можно было

использовать как органическое удобрение, поскольку гель и жидкая фаза не содержали опасных компонентов (Sigawi et al., 2010). Повышение скорости деградации ФА возможно путем гетерологичной экспрессии слитых генов ферментов РМФ-пути (ГФС и ФГИ) метилотрофов, причем не только у бактерий, но и в растениях (Ogita et al., 2007). Экспрессия метилотрофных генов ГФС и ФГИ повышала устойчивость трансгенных растений к ФА и способность удалять это соединение из атмосферы (на 20 %) и, таким образом, делала их полезными для снижения загрязнения воздуха при синдроме «больного дома», вызываемом выделением CH_2O новой мебелью, содержащей фенолформальдегидные смолы.

Недавно обнаруженная способность митанотрофов синтезировать сидерофор метанобактин, мобилизующий Cu^{2+} для ММО и защищающий клетки от избытка токсичных металлов и радионуклидов, может применяться для извлечения меди из различных минеральных источников и биоремедиации воды, используемой для охлаждения реакторов АЭС или отвалов урановых рудников (Троценко, Хмеленина, 2008).

Метилотрофы, выделенные из природных источников и активных илов с селективным давлением различных C_1 -соединений и используемые в разрабатываемых нами биореакторах, отвечают специфическим требо-

ваниям технологического процесса очистки воздуха и промстоков, поскольку избирательно разлагают компонент(ы) выбросов без образования нежелательных побочных продуктов при выращивании на минимальной среде. Клетки культур хорошо фиксируются на различных сорбентах (полиакриламидное волокно, керамзит, пенополивинилформаль), легко адаптируются к условиям биореакторов и сохраняют высокую степень жизнеспособности при лиофилизации, замораживании на гигроскопичных носителях, не теряя специфических физиолого-биохимических свойств при длительном хранении (-70°C). Обеспечение иммобилизованными клетками метилотрофов полной конверсии ряда токсичных соединений в проточных условиях открывает перспективы их широкого использования для целей биodeградации и биоремедиации (Троценко и др., 2005; Троценко и др., 2010).

Итак, несмотря на успехи в активных исследованиях удивительной структурно-функциональной организации аэробных метилотрофов, их поистине неисчерпаемый биотехнологический потенциал пока реализован поверхностно. Однако совместными усилиями микробиологов, биохимиков, генетиков и биотехнологов, несомненно, будет достигнуто более многообразное и эффективное практическое использование их уникального метаболизма.

Список литературы

- Безбородов А.М., Загустина Н.А., Попов В.О. (2008) Ферментативные процессы в биотехнологии. М.: Наука, 335 с.
- Волова Т.Г., Севастьянов В.И., Шишацкая Е.И. (2006) Полиоксиалканоаты – биоразрушаемые полимеры для медицины. Красноярск: Платина, 287 с.
- Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Малашенко Ю.А., Пинчук Г.Э. (1992) Микробный синтез экзополисахаридов на C_1 - C_2 -соединениях. Киев: Наукова думка, 212 с.
- Диканская Э.М. (1987) Биотехнологический потенциал метилотрофных бактерий и пути его реализации. В: Троценко Ю.А. (Ред.) Сб. науч. трудов «Биохимия и физиология микроорганизмов». ОНТИ НЦБИ АН СССР, Пушкино, с. 142-158.

Доронина Н.В., Ежов В.А., Бесчастный А.П., Троценко Ю.А. (2010) Биосинтез биопротектора эктоина аэробными метилотрофными бактериями. Прикл. биохим. микробиол. 46: 187-190.

Иванова Е.Г., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. (2006) Аэробные метанотрофы как симбионты растений. В: Гальченко В.Ф. (Ред.) Труды Института микробиологии им. С.Н. Виноградского, Т. 13. М.: Наука, с. 262-283.

Логинова Н.В., Троценко Ю.А. (1980) Образование экзополисахарида *Blastobacter viscosus* при росте на среде с метанолом. Прикл. биохим. микробиол. 16: 331-334.

Максимова Н.П. (2005) Метаболизм ароматических соединений у метилотрофных бактерий: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Минск, 43 с.

Малашенко Ю.Р., Соколов И.Г., Романовская В.А. (1987) Микробный метаболизм неростовых субстратов. Киев: Наукова думка, 191 с.

Мякенький В.И., Курдиш И.К. (1991) Микробиологическое окисление метана угольных шахт. Киев: Наукова думка, 148 с.

Ножевникова А.Н., Каллистова А.Ю., Кевбрина М.В. (2006) Эмиссия и окисление метана на полигоне захоронения твердых бытовых отходов. В: Гальченко В.Ф. (Ред.) Труды Института микробиологии им. С.Н. Виноградского, Т. 13. М.: Наука, с. 182-191.

Плеханова Ю.В., Фирсова Ю.Е., Доронина Н.В., Решетиллов А.Н. (2012) Аэробные метилобактерии как основа биосенсора для детекции дихлорметана. Прикл. биохим. микробиол. 48: (в печати).

Плясов Ю.М. (1988) Комплексная оценка питательной ценности кормового микробного белка. Биотехнология 4: 402-408.

Таирбеков М.Г., Парфенов Г.П., Заттлер К, Кранц Е., Вюнше Л., Шлуттинг А., Малышева Г.И. (1985) Исследование скорости роста метанассимилирующих бактерий в невесомости. Космическая биология и авиакосмическая медицина 19: 83-84.

Троценко Ю.А., Доронина Н.В., Хмеленина В.Н. (2005) Биотехнологический потенциал аэробных метилотрофных бактерий: настоящее и будущее. Прикл. биохим. микробиол. 41: 433-441.

Троценко Ю.А., Доронина Н.В., Торгонская М.Л. (2010) Аэробные метиловобактерии. ОНТИ ПНЦ РАН, Пушино, 325 с.

Троценко Ю.А., Белова Л.Л. (2000) Организация и регуляция биосинтеза полигидроксибутирата/валерата у бактерий. Микробиология 69: 753-763.

Троценко Ю.А., Торгонская М.Л. (2011) Метилотрофные дрожжи. «ТР-Принт», М., 313 с.

Троценко Ю.А., Хмеленина В.Н. (2008) Экстремофильные метанотрофы. ОНТИ ПНЦ РАН, Пушино, 208 с.

Федоров Д.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. (2011) Фитосимбиоз аэробных метиловобактерий: новые факты и гипотезы. Микробиология 80: 435-446.

Bachhawat A.K., Ganguli D., Kaur J., Kasturia N., Thakur A., Kaur H., Kumar A., Yadav A. (2009) Glutathione production in yeast. In: Satyanarayana T., Kunze G. (Eds.) Yeast biotechnology: diversity and applications, vol. 259. Ch. 13. Dordrecht: Springer Science + Business Media B.V., p. 259-280.

Baerends R.J.S., De Hustler E., Geertman J.-M.A., Daran J.-M., Van Maris A.J.A., Veenhuis M., Van der Klei I.J., Pronk J.T. (2008) Engineering for analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* strain that uses formaldehyde as an auxiliary substrate. Appl. Environ. Microbiol. 74: 3182-3188.

Bélanger L., Figueira M.M., Bourque D., Morel L., Béland M., Laramée L., Groleau D., Míguez C.B. (2004) Production of heterologous protein by *Methylobacterium extorquens* in high cell density fermentation. FEMS Microbiol. Lett. 231: 197-204.

Bodrossy L., Kovacs K.L. (1994) Methane utilizing bacteria and their biotechnological applications. Indian J. Experim. Biol. 32: 443-449.

Bothe H., Jensen K.M., Mergel A., Larsen J., Jorgensen C., Bothe H., Jorgensen L. (2002) Heterotrophic bacteria growing in association with *Methylococcus capsulatus* (Bath) in a single cell protein production process. Adv. Appl. Microbiol. 59: 33-39.

Bourque D., Pomerleau Y., Groleau D. (1995) High-cell-density production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) from methanol by *Methylobacterium extorquens*: production of high-molecular-mass PHB. Appl. Microbiol. Biotechnol. 44: 367-376.

Chet I., Inbar J. (1994) Biological control of fungal pathogens. Appl. Biochem. Biotech. 48: 37-43.

Clark D.S., Geresh S., DiCosmo R. (1995) Enantioselective oxidation of 2-methyl-1-alkanols by alcohol oxidase from methylotrophic yeasts. Bioorg. Medic. Chem. Lett. 5: 1383-1388.

Cos O., Ramón R., Montesinos J.L., Valero F. (2006) Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. Microb. Cell Fact. 5: 17.

Cregg J.M., Lin Cereghino J., Shi J., Higgins D.R. (2000) Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. Mol. Biotechnol. 16: 23-52.

Dalton H. (1985) Implication of the nature of methane monooxygenase on carbon assimilation in methanotrophs. In: Poole R.K., Dow C.S. (Eds.) Microbial gas metabolism, mechanistic, metabolic and biotechnological aspects. London: Acad. Press, p. 201-208.

De Boer L., Grobben G., Vrijbloed J.W., Dijkhuisen L. (1990) Biosynthesis of aromatic amino acids in *Nocardia* sp. 239: effects of amino acid analogues on growth and regulatory enzymes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 33: 183-189.

Eisenberg A., Seip J.E., Gavagan J.E., Payne M.S., Anton D.L., DiCosimo R. (1997) Pyruvic acid production using methylotrophic yeast transformants as catalyst. J. Mol. Catalysis B: Enzymatic 2: 223-232.

Flanagan W.P. (1998) Biodegradation of dichloromethane in a granular activated carbon fluidized-bed reactor. Water Environ. Res. 70: 60-66.

Gellissen G., Kunze G., Gaillardin C., Cregg J.M., Berardi E., Veenhuis M., Van der Klei I. (2005) New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica* – a comparison. FEMS Yeast Res. 5: 1079-1096.

Gidijala L., Kiel J.A.K.W., Douma R.D., Seifar R.M., Van Gulik W.M., Bovenberg R.A.L., Veenhuis M., Van der Klei I.J. (2009) An engineered yeast efficiently secreting penicillin. PLoS ONE 4: e8317.

Goeller K., Galinski E.A. (1999) Protection of a model enzyme (lactate dehydrogenase) against heat, urea and freeze-thaw treatment by compatible solute additive. J. Mol. Catal. B. Enzymic 7: 37-45.

Gonchar M.V., Maidan M.M., Moroz O.M., Woodward J.R., Sibirny A.A. (1998) Microbial O₂- and H₂O₂-electrode sensors for alcohol assays based on the use of permeabilized mutant yeast cells as the sensitive bioelements. Biosens. Bioelectron. 13: 945-952.

- Gonchar M., Maidan M., Pavlishko H., Sibirny A. (2001) A new oxidase-peroxidase kit for ethanol assays in alcoholic beverages. *Food Technol. Biotechnol.* 39: 37-42.
- Graf R., Anzali S., Buenger J., Pfluecker F., Driller H. (2008) The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant. *Clinics Dermatol.* 26: 326-333.
- Guelce H., Guelce A., Kavanoz M., Coscun H., Yildiz A. (2002) A new amperometric enzyme electrode for alcohol determination. *Biosens. Bioelectron.* 17: 517-521.
- Hall E.A.H., Preuss M., Gooding J.J. (1998) Exploring sensors to monitor some environmental discharges. In: Nikolelis D.P., Krull U.J., Wang J., Mascini M. (Eds.) *Biosensors for direct monitoring of environmental pollutants in field.* London: Kluwer Acad. Publ., p. 227-237.
- Hammer G., Harrison D.E.F. (1980) Single cell protein: the technology, economics and future potential. In: Harrison D.E.F., Higgins I.J., Watkinson R. (Eds.) *Hydrocarbons in biotechnology.* London: Heyden, p. 59-73.
- Hanson A.D., Roje S. (2001) One-carbon metabolism in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 119-137.
- Hartner F.S., Glieder A. (2006) Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. *Microb. Cell Fact.* 5: 39.
- Higgins I.J., Best D.J., Hammond R.C. (1980) New findings in methane-utilizing bacteria highlight their importance in the biosphere and their commercial potential. *Nature.* 286: 561-564.
- Hou C.T., Laskin A.I., Patel R.N. (1978) Growth and polysaccharide production by *Methylocystis parvus* OBBP on methanol. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 800-804.
- Indiragandhi P., Anandham R., Kim K., Yim W., Madhaiyan M., Sa T. (2008) Induction of defense responses in tomato against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* by regulating the stress ethylene level with *Methylobacterium oryzae* CBMB20 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *World J. Microbiol. Biotech.* 24: 1037-1045.
- Ishikawa K., Toda-Murakoshi Y., Ohnishi F., Kondo K., Osumi T., Asano K. (2008) Medium composition suitable for L-lysine production by *Methylophilus methylotrophus* in fed-batch cultivation. *J. Biosci. Bioeng.* 106: 574-579.
- Izumi Y., Yoshida T., Miyazaki S.S., Mitsunaga T., Ohshiro T., Shima M., Miyata A., Tanabe T. (1993) L-serine production by a methylotroph and its related enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 427-432.
- Kanamaru K., Iwamura Y., Mikami Y., Obi Y., Kisaki T. (1982) 2-O-Methyl-D-mannose in an extracellular polysaccharide from *Hyphomicrobium* sp. *Agric. Biol. Chem.* 46: 2419-2424.
- Kato N., Kobayashi H., Shima M., Sakazawa C. (1986) Dihydroxyacetone production from methanol by a dihydroxyacetone kinase deficient mutant of *Hansenula polymorpha*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23: 180-186.
- Keppler F., Hamilton J.T.G., Brass M., Roeckmann T. (2006) Methane emissions from terrestrial plants under aerobic conditions. *Nature.* 439: 187-191.
- Khmelenina V.N., Kalyuzhnaya M., Sakharovsky V.G., Suzina N.E., Trotsenko Y.A., Gottschalk G. (1999) Osmoadaptation in halophilic and alkaliphilic methanotrophs. *Arch. Microbiol.* 172: 321-329.
- Lacava P.T., Silva-Stenico M.E., Araújo W.L., Simionato A.V.C., Carrilho E., Tsai S.M., Azevedo J.L. (2008) Detection of siderophores in endophytic bacteria *Methylobacterium* spp. associated with *Xilella fastidiosa* subsp. *pauca*. *Pesq. Agropec. Bras.* 43: 521-528.

Little C.K., Palumbo A.V., Herbes S.E., Lidstrom M.E., Tyndall E.R.L., Gilmer P.J. (1988) Trichloroethylene biodegradation by a methane-oxidizing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 951-956.

Macauley-Patrick S., Fazenda M.L., McNeil B., Harvey L.M. (2005) Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast.* 22: 249-270.

Madhaiyan M., Poonguzhali S., Senthilkumar M., Seshadri S., Chung H., Yang J., Sundaram S., Sa T. (2004) Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* sp. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45: 315-324.

Misaki A., Tsuburaya Y., Kakuta M. (1979) D-Allose-containing polysaccharide synthesized from methanol by *Pseudomonas* sp. *Carbohydrate Res.* 75: 8-19.

Nakagawa T., Inagaki A., Ito T., Fujimura S., Miyaji T., Yurimoto H., Kato N., Sakai Y., Tomizuka N. (2006) Regulation of two distinct alcohol oxidase promoters in the methylotrophic yeast *Pichia methanolica*. *Yeast.* 23: 15-22.

Nichols P.D., White D.C. (1989) Accumulation of polyhydroxybutyrate in a methane-enriched, halogenated hydrocarbon-degrading soil column: implications for microbial community structure and nutritional status. *Hydrobiologia.* 176/177: 369-377.

Odac D., Timur S., Telefoncu A. (2004) Carboxyl esterase-alcohol oxidase based biosensor for the aspartame determination. *Food Chemistry.* 84: 493-496.

Odom J.M. (2006) Antioxidant activity from methanotrophic biomass. US Patent № 20060045871.

Oh D.B., Park J.S., Kim M.W., Cheon S.A., Kim E.J., Moon H.Y., Kwon O., Rhee S.K., Kang H.A. (2008) Glycoengineering of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* for the production of glycoproteins with trimannosyl core N-glycan by blocking core oligosaccharide assembly. *Biotechnol. J.* 3: 659-668.

Oren A. (2002) Halophilic microorganisms and their environments. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 545 p.

Orita I., Sakamoto N., Kato N., Yurimoto H., Sakai Y. (2007) Bifunctional enzyme fusion of 3-hexulose-6-phosphate synthase and 6-phospho-3-hexuloisomerase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76: 439-445.

Osawa F., Fujii T., Nishida T., Tada N., Ohnishi T., Kobayashi O., Komeda T., Yoshida S. (2009) Efficient production of L-lactic acid by Crabtree-negative yeast *Candida boidinii*. *Yeast.* 26: 485-496.

Paryzhak S., Demkiv O., Gayda G. (2007) Enzyme- and cells-based biosensors for assay of formaldehyde in vaccines. In: Proc. 2nd Polish-Ukrainian Weigl Conference «Microbiology in the XXI century». Warsaw Agricult. Univ. SGGW, Warsaw, p. 170-173.

Popov V.O., Lamzin V.S. (1994) NAD⁺-dependent formate dehydrogenase. *Biochem. J.* 301: 625-643.

Reshetnikov A.S., Khmelenina V.N., Trotsenko Y.A. (2006) Characterization of the ectoine biosynthesis genes in obligate haloalkalotolerant methanotroph *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z. *Arch. Microbiol.* 184: 286-296.

Ryabova O.B., Chmil O.M., Sibirny A.A. (2003) Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Res.* 2003. 4: 157-164.

- Sakai Y., Tani Y., Kato N. (1999) Biotechnological application of cellular functions of the methylotrophic yeast. *J. Mol. Catalysis B Enzymatic*. 6: 161-173.
- Schaefer J.K., Miller L.G., Oremland R.S., Murrell J.C. (2007) Bacterial cycling of methyl halides. *Adv. Appl. Microbiol.* 61: 307-346.
- Sibirny V., Demkiv O., Sigawi S., Paryzhak S., Klepach H., Korpan Y., Smutok O., Nisnevich M., Gayda G., Nitzan Y., Puchalski C., Gonchar M. (2011) Formaldehyde oxidizing enzymes and genetically modified yeast *Hansenula polymorpha* cells in monitoring and removal of formaldehyde. In: Einschlag F.S.G. (Ed.) *Waste water – evaluation and management*, Ch. 6. Rijeka: InTech Publ., p. 115-154.
- Sigawi S., Smutok O., Gayda G. (2010) Enzyme and yeast-cell based bioreactors for formaldehyde removal from air. In: *Proc. the 46th Conference of IChE*. Haifa, p. 39.
- Skrede A., Ahlstrøm Ø. (2002) Bacterial protein on natural gas: a new potential feed ingredient for dogs evaluated using the blue fox as model. *J. Nutr.* 132: 1668S-1669S.
- Smutok O., Ngounou B., Pavlishko H., Gayda G., Gonchar M., Schuhmann W. (2006) A reagentless biosensor based on alcohol oxidase/peroxidase and an Os-complex modified electrodeposition paint. *Sensors Actuators B: Chem.* 113: 590-598.
- Stasiuk N.L., Gayda G.Z., Koval'chuk L.P., Stasyk O.V., Gonchar M.V. (2010) Human arginase I from the recombinant yeast *Hansenula polymorpha*: isolation and characterization of the enzyme. *Ukr. Biochim. Zh.* 82: 14-21.
- Sulter G., Looyenga L., Veenhuis M., Harder W. (1990) Occurrence of peroxisomal membrane proteins in methylotrophic yeasts grown under different conditions. *Yeast* 6: 35-43.
- Takayama T., Endo F., Nozawa T., Masuda Y., Mori M., Kanayama T. (1978) Process for producing a polysaccharide using *Pseudomonas polysaccharogenes* M-30. US Patent 4230800.
- Tani Y. (1991) Production of useful chemicals by methylotrophs. *Biotechnology*. 18: 253-270.
- Tishkov V.I., Galkin A.G., Fedorchuk V.V., Savitsky P.A., Rojkova A.M., Gieren H., Kula M.-R. (1999) Pilot scale production and isolation of recombinant NAD⁺- and NADP⁺-specific formate dehydrogenases. *Biotechnol. Bioeng.* 64: 188-193.
- Tsujimoto N., Gunji Y., Ogawa-Miyata Y., Shimaoka M., Yasueda H. (2006) L-lysine biosynthetic pathway of *Methylophilus methylotrophus* and construction of an L-lysine producer. *J. Biotechnol.* 124: 327-337.
- Trotsenko Y.A., Bystrykh L.V. (1990) Production of metabolites by methylotrophic yeasts. *Biotechnol. Adv.* 8: 105-119.
- Ubiyvovk V.M., Ananin V.M., Malyshev A.Y., Kang H.A., Sibirny A.A. (2011) Optimization of glutathione production in batch and fed-batch cultures by the wild-type and recombinant strains of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *BMC Biotech.* 11: 8.
- Ueda S., Matsumoto S., Takagi A., Yamane T. (1992) Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from methanol and n-amyl alcohol by the methylotrophic bacteria *Paracoccus denitrificans* and *Methylobacterium extorquens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3574-3579.
- Van Dien S.J., Okubo Y., Hough M.T., Korotkova N., Taitano T., Lidstrom M.E. (2003) Reconstruction of C₃ and C₄ metabolism in *Methylobacterium extorquens* AM1 using transposon mutagenesis. *Microbiology*. 149: 601-609.
- Verduyn C., Van Dijken J.P., Scheffers W.A. (1983) A simple, sensitive, and accurate alcohol electrode. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 1049-1055.

Westlake R. (1986) Large-scale continuous production of single cell protein. Chem. Ing. Tech. 58: 934-937.

Woodward J. (1990) Biochemistry and applications of alcohol oxidase from methylotrophic yeasts. In: Codd G.A., Dijkhuisen L., Tabita F.R. (Eds.) Autotrophic microbiology and one-carbon metabolism. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., p. 193-225.

Yanase H., Sato Y., Kita K., Sato Y., Kato N. (1993) Preparation of [1-¹³C]D-glucose 6-phosphate from [¹³C]methanol and D-ribose 5-phosphate with methylotrophic enzymes. Biosci. Biotechnol. Biochem. 57: 308-312.

Yurimoto H., Oku M., Sakai Y. (2011) Yeast methylotrophy: metabolism, gene regulation and peroxisome homeostasis. Int. J. Microbiol. ID 101298: 1-8.

Zhang M., Wang H.Y. (1994) Hydrogen peroxide production using chemically treated *Pichia pastoris* cells. Enzyme Microb. Technol. 16: 10-17.

Zhao S., Fan C., Hu X., Chen J., Feng H. (1993) The microbial production of polyhydroxybutyrate from methanol. Appl. Biochem. Biotechnol. 39/40: 191-199.

Aerobic Methylotrophs – Promising Objects of Modern Biotechnology

Yuri A. Trotsenko and Maria L. Torgonskaya

*G. K. Skryabin Institute of Biochemistry
and Physiology of Microorganisms RAS,
5 Science avenue, Pushchino,
Moscow region, 142290 Russia*

The review analyzes and summarizes the present state of art and trends of application of the unique metabolism of multifunctional methylotrophic bacteria and yeasts in various areas of modern biotechnology: biosynthesis, biocatalysis, bioanalytics and bioremediation.

Keywords: aerobic methylotrophic bacteria, methylotrophic yeasts, single cell protein, synthesis of biopolymers, homo- and heterologic proteins production, bioprotectants, biocatalysis, biodegradation, bioanalytics.
