

УДК 579.258+579.222

ЭКСПРЕССИЯ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ ФЕП-КАРБОКСИЛАЗЫ В *METHYLOCOCCUS CAPSULATUS* MIR: ВЛИЯНИЕ НА РОСТОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ БИОМАССЫ МЕТАНОТРОФА

© 2024 г. С. Ю. Бут^{a, b, *}, О. Н. Розова^{a, b}, С. В. Чистякова^b, Д. С. Потапова^c,
В. Н. Хмеленина^b, И. И. Мустахимов^{a, b}

^aИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071, Россия

^bФИЦ “Пушинский научный центр биологических исследований РАН”, ИБФМ РАН,

Московская обл., Пушкино, 142290, Россия

^cТульский государственный университет, Тула, 300012, Россия

*e-mail: sergeybut20063@gmail.com

Поступила в редакцию 20.06.2024 г.

После доработки 24.06.2024 г.

Принята к публикации 24.06.2024 г.

Methylococcus capsulatus MIR — штамм метанотрофных бактерий, потенциально пригодный для использования в биотехнологии получения кормового белка и других продуктов с добавленной стоимостью из метана. Геномный анализ не выявил у *Mc. capsulatus* MIR известных путей С3-карбоксилирования, необходимых для восполнения интермедиатов цикла трикарбоновых кислот и полноценного функционирования метаболизма. Ген *perc*, кодирующий ФЕП-карбоксилазу у *Methylomonas rapida* 12, вносили в клетки *Mc. capsulatus* MIR на плазмиде под контролем промотора средней силы. Экспрессия гетерологичной ФЕП-карбоксилазы в клетках рекомбинантного штамма привела к повышению содержания глутамата, глицина и лизина, однако не привела к увеличению скорости роста культуры. Таким образом, внесение гетерологичной ФЕП-карбоксилазы, осуществляющей реакцию С3-карбоксилирования, способствует повышению пищевой ценности биомассы метанотрофа.

Ключевые слова: метанотрофы, белок одноклеточных, *Methylococcus capsulatus*, ФЕП-карбоксилаза

DOI: 10.31857/S0026365624060173

Метан является вторым по распространенности после диоксида углерода парниковым газом. При этом концентрация метана в атмосфере в последнее время выросла до угрожающих значений, что вносит значительный вклад в глобальное потепление (Schaefer et al., 2016; Tollefson, 2022). Одним из основных источников метана является попутный газ, выделяемый при добыче нефти, который в настоящее время большей частью не используется, а просто сжигается. Аэробные метанотрофы — специализированная группа бактерий, использующих метан и метанол в качестве источников углерода и энергии (Hanson, Hanson, 1996). Благодаря способности синтезировать из метана все клеточные компоненты, метанотрофы рассматриваются в качестве биокатализаторов при получении широкого спектра органических соединений (Henard et al., 2016; Strong et al., 2016).

Термотолерантный метанотроф *Methylococcus capsulatus* MIR, выделенный из ила городских очистных сооружений Иркутска, обладает высокой скоростью роста при 42°C и перспективен в качестве продуцента кормового белка (Oshkin et al., 2022).

Анализ доступных геномов метанотрофов рода *Methylococcus* не выявил гены, кодирующие известные ферменты С3-карбоксилирования (Oshkin et al., 2021). Вместе с тем данные анаплеоротические реакции важны в метаболизме бактерий, поскольку восполняют пул соединений, образующихся в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК) и расходуемых на синтез аминокислот и вторичных метаболитов. Метанотрофы I типа используют рибулозомонофосфатный цикл в качестве основного пути ассимиляции С1-соединений. Кроме того, у этих бактерий присутствуют гены

серинового пути, который, однако, считается неполным из-за отсутствия генов фосфоенолпируват (ФЕП) карбоксилазы — одного из ключевых ферментов серинового пути (But et al., 2019). Единственным исключением из этой закономерности являются метанотрофы рода *Methylomonas*, поскольку в их геномах имеется полный набор генов серинового цикла. У других метанотрофов I типа, в частности, у *Methylothermobacter alcaliphilum* 20Z, имеются пируваткарбоксилаза и ФЕП-карбоксикиназа, по-видимому, выполняющие функцию восполнения оксалоацетата — предшественника аминокислот аспартатной группы. Ранее было обнаружено, что сверхэкспрессия СЗ карбоксилаз может улучшать ростовые характеристики гетеротрофных бактерий за счет увеличения потока углерода в ЦТК (Koffas et al., 2003; Buch et al., 2010). Аналогичный эффект можно ожидать для метанотрофов.

Целью данной работы являлось изучение влияния экспрессии гетерологичной ФЕП-карбоксилазы из *Methylomonas rapida* 12 на ростовые характеристики и накопление аминокислот у термотолерантного метанотрофа *Mc. capsulatus* MIR.

Mc. capsulatus MIR выращивали на среде П (Хмеленина и соавт., 1994) в атмосфере метана и воздуха при 42°C. Для сверхэкспрессии ФЕП-карбоксилазы была создана плазмида, в которой ген *perc* из *Methylomonas rapida* 12 находился под контролем промотора *PphaC* из *Cupriavidus necator* H16. Ранее *PphaC* зарекомендовал себя как промотор средней силы при использовании

в клетках *Mc. capsulatus* (Rumah et al., 2023). Полученную плазмиду pAWP-*perc* вводили в клетки *Mc. capsulatus* MIR с помощью конъюгации со штаммом *E. coli* S-17-1. Трансконъюганты отбирали на среде П, содержащей 25 мкг/мл канамицина. Для получения рекомбинантной ФЕП-карбоксилазы ген *perc* клонировали в экспрессионном векторе pET28b(+), полученной плазмидой трансформировали штамм *E. coli* Rosetta (DE3). Клетки, несущие плазмиду, выращивали на среде LB до ОП₆₀₀ ~ 0.6, индукцию экспрессии осуществляли с помощью добавления изопропил-β-D-1-тиогактопиранозид (ИПТГ) до концентрации 0.5 мМ и инкубацией в течение ночи при 18°C. Рекомбинантный фермент очищали на колонке с Ni-NTA-агарозой ("Quiagen", Германия), элюируя градиентом имидазола. Активность ФЕП-карбоксилазы измеряли спектрофотометрически при 340 нм в реакционной смеси, содержащей 50 мМ MOPS-KOH (pH 9.0), 5 мМ MgCl₂, 5 мМ KHCO₃, 3 мМ НАДН, 5 Е малат-дегидрогеназы из *Methylosinus trichosporium* OB3b (Розова и соавт., 2019). Для измерения содержания аминокислот *Mc. capsulatus* MIR/pAWP-*perc* выращивали в качалочных колбах с 200 мл среды П, содержащей 25 мкг/мл канамицина. Колбы заполняли смесью метан-воздух (1 : 1), культивировали при 42°C в течение 2 сут. В качестве контроля использовали клетки, несущие плазмиду pAWP-*PphaC* без гена *perc*. Биомассу собирали, лиофилизировали, метаболиты экстрагировали

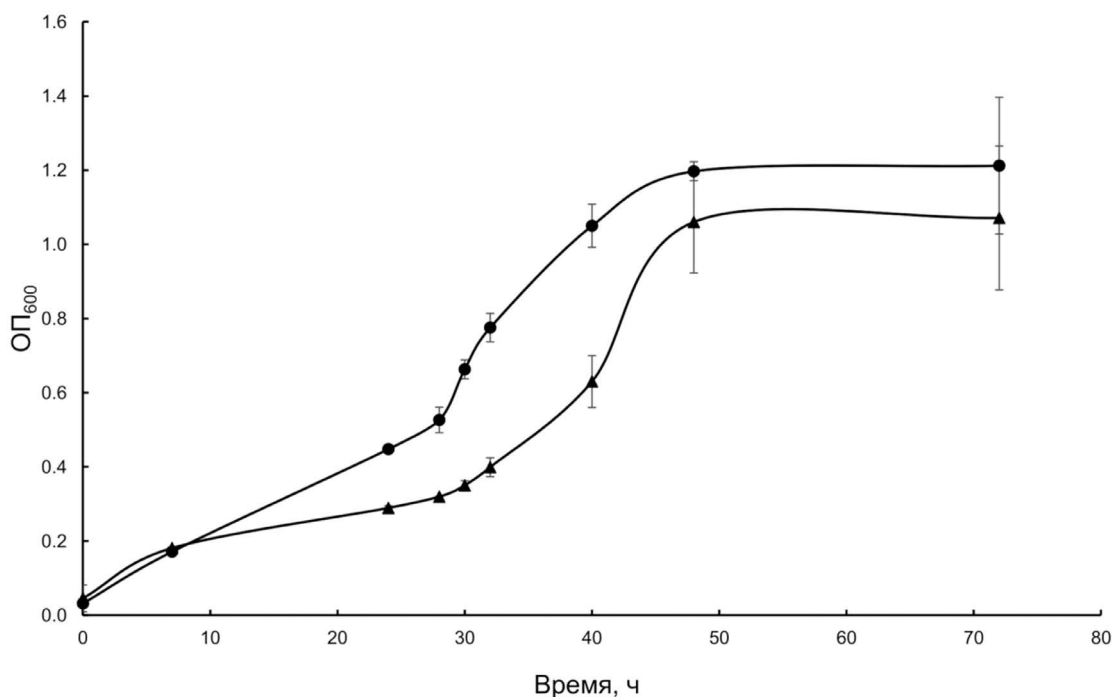


Рис. 1. Кривые роста штаммов MIR/pAWP-PphaC (1) и MIR/pAWP-*perc* (2).

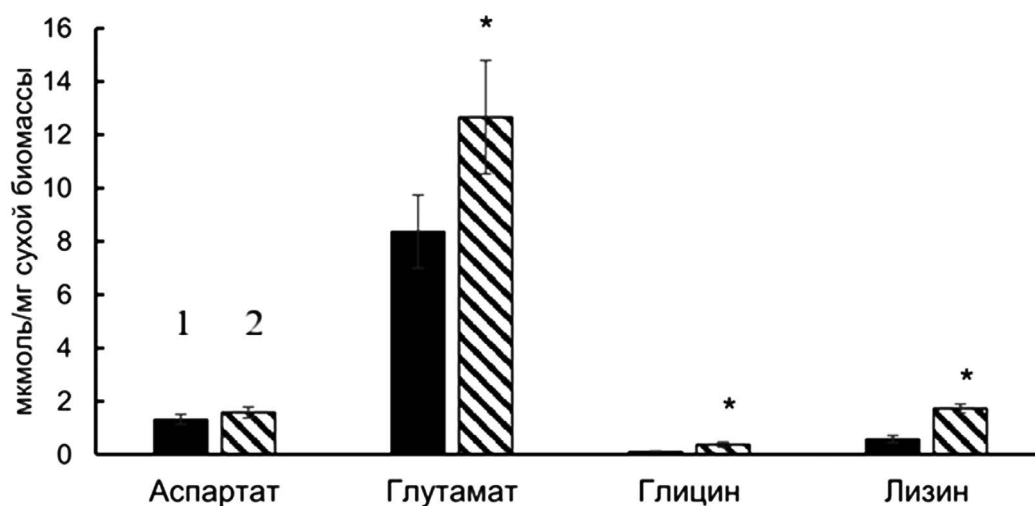


Рис. 2. Накопление аминокислот клетками штаммов MIR/pAWP-Pphac (1) и MIR/pAWP-perc (2). Бары представляют стандартное отклонение для трех независимых экспериментов. Для определения статистической значимости различий использовали тест Стьюдента; * $p < 0.05$.

80%-м хлороформом. Экстракты упаривали досуха, растворяли в воде, несколько раз экстрагировали метанолом, водную фракцию использовали для анализа аминокислот. Анализ проводили на колонке Reprosil OPA (“Dr. Maisch”, Германия), как описано ранее (But et al., 2020).

Функциональность ФЕП-карбоксилазы из *Methylomonas methanica* 12 была доказана с помощью гетерологичной экспрессии в *E. coli*. Фермент катализировал карбоксилирование ФЕП до оксалоацетата в присутствии бикарбоната-ионов. Максимальную активность рекомбинантная ФЕП-карбоксилаза проявляла при 45°C и pH 9.0. Активность фермента в 2.5 раза стимулировалась внесением в реакционную смесь пирувата. Фермент подчинялся кинетике Хилла. В присутствии 1 мМ пирувата активность фермента (V_{max}) составила 22.2 ± 0.6 Е/мг белка, а значение $S_{0.5}$ для ФЕП – 0.26 ± 0.02 мМ. Пируват является одним из центральных метаболитов у метанотрофов I типа. Повышение активности и аффинности к субстрату ФЕП-карбоксилазы из *Mm. methanica* 12 в присутствии пирувата делают данный фермент удачным выбором для создания синтетического анаплеротического пути у *Mc. capsulatus* MIR.

Гетерологичная экспрессия ФЕП-карбоксилазы в *Mc. capsulatus* MIR не привела к увеличению скорости роста по сравнению с контрольным штаммом, несущим пустой вектор (рис. 1), при этом штамм, несущий ген *perc*, накапливал меньше биомассы. Анализ свободных аминокислот выявил повышение уровня глутамата, глицина и лизина (рис. 2).

Данный результат является логичным, поскольку лизин и глутамат синтезируются из интермедиатов

ЦТК – оксалоацетата (через аспартат) и 2-оксоглутарата соответственно. Примечательно, что при этом содержание аспартата в клетках модифицированного штамма не изменилось, что, возможно, связано с оттоком аминокислоты на биосинтез. Особый интерес представляет увеличение содержания лизина. Поскольку данная аминокислота является незаменимой, биомасса, обогащенная лизином, имеет повышенную ценность с биотехнологической точки зрения. Экспрессия ФЕП-карбоксилазы не повлияла на скорость роста, что можно объяснить тем фактом, что, в отличие от гетеротрофных бактерий (Koffas et al., 2003; Buch et al., 2010), ЦТК у метанотрофов не является основным источником энергии, а значительная часть восстановительных эквивалентов образуется при последовательном окислении метана до CO_2 .

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках проекта “Развитие технологий геномного редактирования для решения инновационных задач промышленных и пищевых биотехнологий” № 075-15-2021-1071, финансируемого Министерством науки и высшего образования РФ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Розова О. Н., Хмеленина В. Н., Мустахимов И. И., Бут С. Ю., Троценко Ю. А. Свойства рекомбинантного малик-фермента у аэробного метанотрофа *Methylosinus trichosporium* // Биохимия. 2019. Т. 84. С. 532–539.
- Rozova O. N., Khmelenina V. N., Mustakhimov I. I., But S. Yu., Trotsenko Yu. A. Properties of malic enzyme from the aerobic methanotroph *Methylosinus trichosporium* // Biochemistry (Moscow). 2019. V. 84. P. 390–397.
- Хмеленина В. Н., Бесчастный А. П., Гаязов А. П., Троценко Ю. А. Влияние пирофосфата на рост и метаболизм *Methylomonas methanica* // Микробиология. 1994. Т. 63. С. 188–193.
- Buch A., Archana G., Naresh Kumar G. Heterologous expression of phosphoenolpyruvate carboxylase enhances the phosphate solubilizing ability of fluorescent pseudomonads by altering the glucose catabolism to improve biomass yield // Bioresour Technol. 2010. V. 101. P. 679–687.
- But S. Y., Egorova S. V., Khmelenina V. N., Mustakhimov I. I. Malyl-CoA lyase provides glycine/glyoxylate synthesis in type I methanotroph // FEMS Microbiol. Lett. 2020. V. 367. Art. fnaa207.
- But S. Y., Egorova S. V., Khmelenina V. N., Trotsenko Y. A. Serine-glyoxylate aminotransferases from methanotrophs using different C1-assimilation pathways // Antonie van Leeuwenhoek. 2019. V. 112. P. 741–751.
- Hanson R., Hanson T. Methanotrophic bacteria // Microbiol. Rev. 1996. V. 60. P. 439–471.
- Henard C. A., Smith H., Dowe N., Kalyuzhnaya M. G., Pienkos P. T., Guarnieri M. T. Bioconversion of methane to lactate by an obligate methanotrophic bacterium // Sci. Rep. 2016. V. 6. Art. 21585.
- Koffas M. A. G., Jung G. Y., Stephanopoulos G. Engineering metabolism and product formation in *Corynebacterium glutamicum* by coordinated gene overexpression // Metab. Eng. 2003. V. 5. P. 32–41.
- Oshkin I. Y., Danilova O. V., But S. Y., Miroshnikov K. K., Suleimanov R. Z., Belova S. E., Tikhonova E. N., Kuznetsov N. N., Khmelenina V. N., Pimenov N. V., Dedysh S. N. Expanding characterized diversity and the pool of complete genome sequences of *Methylococcus* species, the bacteria of high environmental and biotechnological relevance // Front. Microbiol. 2021. V. 12. Art. 756830.
- Oshkin I. Y., Suleimanov R. Z., Khmelenina V. N., Mardanov A. V., Pimenov N. V., Dedysh S. N. Complete genome sequence of *Methylococcus capsulatus* MIR, a methanotroph capable of growth on methanol // Microbiol. Resour. Announc. 2022. V. 11. Art. e0054222.
- Rumah B. L., Claxton Stevens B. H., Yeboah J. E., Stead C. E., Harding E. L., Minton N. P., Zhang Y. In vivo genome editing in type I and II methanotrophs using a CRISPR/Cas9 system // ACS Synth. Biol. 2023. V. 12. P. 544–554.
- Schaefer H., Mikaloff Fletcher S. E., Veidt C., Lassey K. R., Brailsford G. W., Bromley T. M., Dlugokencky E. J., Michel S. E., Miller J. B., Levin I., Lowe D. C., Martin R. J., Vaughn B. H., White J. W. C. A 21st-century shift from fossil-fuel to biogenic methane emissions indicated by ¹³CH₄ // Science. 2016. V. 352. P. 80–84.
- Strong P. J., Kalyuzhnaya M., Silverman J., Clarke W. P. A methanotroph-based biorefinery: potential scenarios for generating multiple products from a single fermentation // Bioresour. Technol. 2016. V. 215. P. 314–323.
- Tollefson J. Scientists raise alarm over “dangerously fast” growth in atmospheric methane // Nature. 2022. <https://doi.org/10.1038/d41586-022-00312-2>

SHORT COMMUNICATIONS

**Expression of Heterologous PEP-Carboxylase in *Methylococcus capsulatus* MIR:
the Influence on Growth Characteristics
and Amino Acid Composition of Methanotrophic Biomass**

**S. Y. But^{1, 2, *}, O. N. Rozova^{1, 2}, S. V. Chistyakova², D. S. Potapova³,
V. N. Khmelenina², I. I. Mustakhimov^{1, 2}**

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences,
Moscow, 119071, Russia

²Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino Scientific Center for Biological Research,
Russian Academy of Sciences, Moscow region, Pushchino, 142290, Russia

³Tula State University, Tula, 300012, Russia

*e-mail: sergeybut20063@gmail.com

Methylococcus capsulatus MIR is a strain of methanotrophic bacteria that is potentially suitable for producing feed protein and other value-added products from methane. Genomic analysis did not reveal in *Mc. capsulatus* MIR known pathways of C3-carboxylation, necessary for the replenishment of intermediates of the tricarboxylic acid cycle and the full functioning of metabolism. The *pepc* gene encoding PEP carboxylase in *Methylomonas rapida* 12 was introduced into *Mc. capsulatus* MIR cells on a plasmid under the control of a medium-strength promoter. Expression of heterologous PEP carboxylase led to an increase in the content of glutamate, glycine and lysine in the cells of the recombinant strain, but did not increase to the growth rate of the culture. Consequently, the introduction of heterologous PEP carboxylase, which carries out the C3-carboxylation reaction, helps to increase the nutritional value of the methanotroph biomass.

Keywords: methanotrophs, single cell protein, *Methylococcus capsulatus*, PEP-carboxylase