

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМОВ МЕТАНОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ: ВОЗМОЖНЫЕ МИШЕНИ И ДОСТУПНЫЙ ИНСТРУМЕНТАРИЙ

© 2022 г. В. Н. Хмеленина^a, С. Ю. Бут^{a, b}, О. Н. Розова^{a, b}, И. Ю. Ошкин^b,
Н. В. Пименов^b, С. Н. Дедыш^{b, *}

^aИнститут биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина, Пушчинский научный центр биологических исследований Российской академии наук, Пушкино, Московская обл., 142290 Россия

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

*e-mail: dedysh@mail.ru

Поступила в редакцию 17.07.2022 г.

После доработки 26.07.2022 г.

Принята к публикации 26.07.2022 г.

Аэробные метанотрофные бактерии – это прокариотические микроорганизмы, обладающие уникальными ферментами, метанмонооксигеназами, позволяющими им использовать метан (CH₄) в качестве ростового субстрата. Эта метаболическая особенность метанотрофов делает их привлекательными объектами биотехнологий, основанных на использовании метана для производства микробного белка и ряда целевых метаболитов. Растущий интерес к этим технологиям обусловлен высокой доступностью CH₄, являющегося основным компонентом природного газа и биогаза, образующегося в результате анаэробной переработки органических отходов. Аэробные метанотрофы окисляют метан при температуре и давлении окружающей среды, поэтому перспективны в качестве биокатализаторов преобразования CH₄ в продукты с добавленной стоимостью. Развитие биотехнологий конверсии метана с применением метанотрофов предполагает привлечение методов геномного редактирования для улучшения характеристик штаммов этих бактерий, используемых для производства. Специфика метаболизма CH₄-использующих бактерий, а также сложности работы с этими объектами долгое время сдерживали развитие метаболической инженерии метанотрофов. В настоящем обзоре рассмотрены успехи последних десятилетий в области метаболической инженерии аэробных метанотрофов, описаны вероятные мишени и доступный инструментарий редактирования геномов этих микроорганизмов. Использование этого инструментария открывает возможности получения штаммов с биотехнологически ценными характеристиками, а также более глубокого изучения метаболических особенностей аэробных метанотрофов.

Ключевые слова: метанотрофные бактерии, разнообразие аэробных метанотрофов, специфика метаболизма метанотрофов, биоконверсия метана, редактирование геномов, метаболическая инженерия

DOI: 10.31857/S0026365622600584

Аэробные метанотрофные бактерии – это группа прокариотических микроорганизмов, специализированных на использовании метана (CH₄) в качестве единственного источника углерода и энергии (Hanson, Hanson, 1996; Гальченко, 2001; Trotsenko, Murrell, 2008; Chistoserdova, Lidstrom, 2013; Khmelena et al., 2018). Способность к окислению метана обусловлена наличием у этих бактерий уникального фермента – метанмонооксигеназы (ММО), которая существует в двух структурно и биохимически различных формах (Murrell et al., 2000; Murrell, Smith, 2010). Одна из форм, мембранная ММО (particulate ММО, рММО), имеется у подавляющего большинства известных метанотрофов и локализована во внутрицитоплазматических мембранах (ВЦМ), выявляемых на ультратонких срезах клеток метанотрофов. Другая форма

этого фермента, растворимая ММО (soluble ММО, sММО), присутствует лишь у некоторых метанотрофов и локализована в цитоплазме. Структурные и каталитические характеристики этих форм ММО, а также история попыток гетерологичной экспрессии этих ферментов в неметанотрофных микроорганизмах освещены в недавнем обзоре (Khider et al., 2021).

Метанотрофные бактерии населяют широкий спектр экосистем (Knief, 2015) и играют ключевую роль в глобальном цикле углерода, снижая потоки парникового газа CH₄ из природных и антропогенных местообитаний в атмосферу (Conrad, 2009). Помимо очевидной биосферной значимости аэробных метанотрофов, эти бактерии имеют большой, но пока лишь частично востребованный биотехнологический потенциал, обусловленный

их способностью осуществлять конверсию метана в различные продукты с добавленной стоимостью (Strong et al., 2015; Pieja et al., 2017; Kalyuzhnaya et al., 2020). Растущий интерес к подобным биотехнологиям обусловлен сравнительной дешевизной и высокой доступностью CH_4 , являющегося основным компонентом природного газа и биогаза, образуемого в результате анаэробной трансформации органических отходов.

Первой реализованной в промышленном масштабе технологией с использованием метанотрофов явилось получение микробной биомассы, пригодной в качестве эффективной белковой добавки в корм сельскохозяйственных животных (“Гаприна”) (Григорян, Горская 1970; Namer, Harrison, 1980; Егоров и соавт., 1990; Лалов, 1991). Уже более полувека активно изучаются возможности использования метанотрофов для получения разнообразных соединений, таких как каротиноиды, полигидроксibuтират и полисахариды (Bothe et al., 2002; Ye et al., 2007), а также для биоремедиации экосистем, загрязненных хлорированными углеводородами (Murrell, Smith, 2010; Smith, Nichol, 2018). В исследованиях последних десятилетий основной упор делается на модификации биохимических путей метанотрофов для получения целевых метаболитов (Kalyuzhnaya et al., 2015; Henard et al., 2016; Garg et al., 2018; Nguyen et al., 2019; Nguyen, Lee, 2019; Pham et al., 2022b). Основные организмы-объекты этих работ по метаболической инженерии, ныне доступный инструментарий для редактирования геномов метанотрофных бактерий, а также возможные мишени направленных модификаций рассмотрены нами ниже.

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ И МЕТАБОЛИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ АЭРОБНЫХ МЕТАНОТРОФОВ

Охарактеризованное разнообразие метанотрофных бактерий. Ныне известные аэробные метанотрофные бактерии формируют три основные филогенетические ветви, две из которых лежат в пределах филума *Proteobacteria*, а третья – в пределах *Verrucomicrobia* (рис. 1). Протеобактериальные метанотрофы, принадлежащие к классам *Alpha-* и *Gamma*proteobacteria, представлены наибольшим числом изученных культур и охарактеризованных таксонов (четыре семейства, около трех десятков родов и шести десятков видов) (Dedysh, Knief, 2018). Перечень этих таксонов включает организмы с различными фенотипическими характеристиками и предпочтениями к росту при различных температурах, рН среды, солёности и проч. Метанотрофы класса *Gamma*proteobacteria высоко специализированы на использовании C_1 -соединений и не растут на полиуглеродных субстратах, таких как сахара или органические кислоты. В числе

Alphaproteobacteria, напротив, имеется ряд факультативных метанотрофов, способных помимо метана использовать ограниченное число органических соединений, таких как ацетат, пируват, этанол и некоторые короткоцепочечные алканы (Dedysh, Dunfield, 2010). Метанотрофные представители *Verrucomicrobia* формируют узкий филогенетический кластер, представленный семейством *Methylacidiphilaceae*, и являются термофильными или мезофильными ацидофилами, населяющими исключительно геотермальные экосистемы (Op den Camp et al., 2009; Schmitz et al., 2021). В отличие от протеобактериальных метанотрофов, представители *Methylacidiphilaceae* являются автотрофами и используют метан в качестве источника энергии, окисляя его до CO_2 , который затем фиксируют в цикле Кальвина (Khadem et al., 2011). Альтернативным источником энергии для этих метанотрофов является H_2 (Schmitz et al., 2021). Более полная информация об охарактеризованных на сегодняшний день аэробных метанотрофах представлена на веб-сайте Methanotroph Commons (<http://www.methanotroph.org>).

Метаболическое разнообразие аэробных метанотрофов. Метанотрофы окисляют CH_4 до метанола (CH_3OH) в присутствии кислорода с образованием одной молекулы воды и потреблением двух электронов и двух протонов. По сравнению с sММО, рММО имеет более высокое средство к метану, ее функционирование коррелирует с более высокой эффективностью роста (Murrell et al., 2000). Для активности sММО необходим НАДН, а непосредственным донором электронов для рММО является убихинол (UQH_2), восстанавливаемый НАДН через комплекс I цепи переноса электронов. Не исключено также, что электроны, образующиеся при окислении метанола, передаются непосредственно на рММО для окисления метана (Lieven et al., 2018). У метанотрофов, имеющих как растворимую, так и мембранную ММО, экспрессия этих ферментов регулируется ионами меди: рММО экспрессируется во время роста при высоком соотношении меди и биомассы, тогда как sММО – при низком соотношении меди к биомассе (Murrell et al., 2000). Благодаря свойству sММО окислять широкий спектр субстратов, включая окисигенирование монооксида углерода, некоторых алканов, алкенов, галогенированных метанов и циклических соединений (задокументировано более чем 100 субстратов, см. обзор Murrell, Smith 2010), изучаются возможности использования метанотрофных бактерий в биоремедиации для разложения ряда загрязняющих веществ, таких как трихлорэтилен (ТХЭ) и хлорированные углеводороды (Smith, Nichol, 2018), а также для синтеза гомохиральных эпоксидов (Jiang et al., 1996, 2010; Khider et al., 2021).

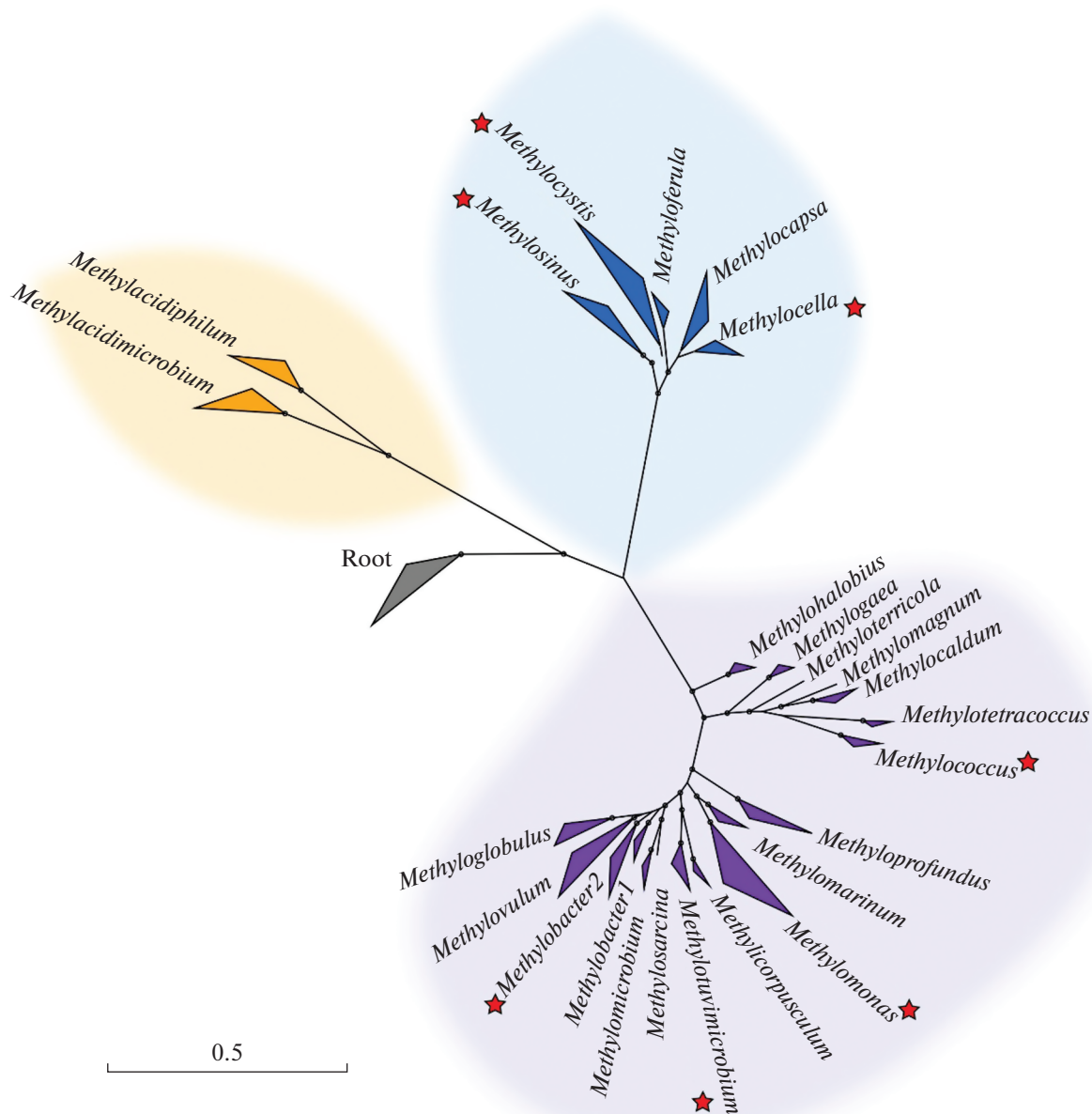


Рис. 1. Филогенетическая дендрогамма, построенная на основании результатов сравнительного анализа 157 последовательностей геномов аэробных метанотрофных бактерий, представленных в базе данных GTDB (Parks et al., 2022). Анализ выполнен с помощью Genome Taxonomy Database toolkit, версия 2.0.0 (Chaumeil et al., 2020). Филогенетические ветви метанотрофных представителей *Verrucomicrobia*, *Alpha*- и *Gamma*proteobacteria выделены оранжевым, синим и лиловым цветами соответственно. Звездочками обозначены роды метанотрофов, представители которых становились объектами исследований с использованием генетических манипуляций. Уровни поддержки (бутстреппы) рассчитаны методом “maximum-likelihood” путем построения 100 альтернативных дендрогамм. Значения бутстреппов более 70% показаны черными кружками. В качестве корня использованы геномы бактерий филума *Calditerrichota*. Маркер – 0.5 замен на одну аминокислотную позицию.

Окисление метанола в формальдегид катализирует метанолдегидрогеназа (МДГ). У метанотрофов имеются две формы МДГ, обе содержат пирролохинолинхинон (PQQ) в качестве простетической группы. Гетеротетрамерная МхaFI-МДГ содержит кальций в активном центре, тогда как

односубъединичная ХохF-МДГ содержит редкоземельный элемент вместо кальция. Окислительные превращения формальдегида в формиат катализируют ферменты тетрагидрофолат (ТГФ)- и тетрагидрометаноферин (ТГМП)-зависимых путей. Последнюю стадию окисления метана до

CO₂ катализирует формиатдегидрогеназа (ФДГ), поставляющая НАДН для монооксигенирования метана или в дыхательную систему для синтеза АТФ. У метанотрофов обнаруживаются до четырех изоформ ФДГ, причем некоторые из них катализируют обратимую реакцию.

Для ассимиляции углерода метанотрофы используют три биохимических пути: сериновый цикл, рибулозомонофосфатный (РМФ) путь и цикл Кальвина. Метанотрофы класса *Alphaproteobacteria* используют сериновый путь, в котором C₁-соединение в форме N₅,N₁₀-метилтен-тетрагидрофолата реагирует с глицином с образованием серина (Chistoserdova, Lidstrom, 2013). Затем аминокетильная группа серина переносится на глиоксилат с образованием глицина и гидроксипирувата, последний в серии реакций трансформируется в глицеральдегид-3-фосфат и пируват – универсальные метаболиты-предшественники всех компонентов клеток. Метанотрофы класса *Gammaproteobacteria* ассимилируют углерод посредством РМФ и серинового путей, функционирующих одновременно. Эта избыточность характерна для метанотрофов, но не для не растущих на метане метилотрофов (Бут и соавт., 2017). Первыми соединениями при построении C–C связи в РМФ пути являются C₆-фосфосахара: гексулозо-6-фосфат, образуемый конденсацией формальдегида и рибулозо-5-фосфата, далее изомеризацией гексулозо-6-фосфата образуется фруктозо-6-фосфат. Эти реакции катализируют два специфических фермента – гексулозофосфатсинтаза (ГФС) и фосфогексулоизомераза (ФГИ). Геномный анализ выявил дупликацию, а иногда и трипликацию генов *hps* у некоторых быстрорастущих метанотрофов (Розова и соавт., 2017), однако влияние количества генов *hps* на физиологические характеристики штаммов предстоит определить. Для распада фосфосахаров и синтеза C₃-соединений эти метанотрофы используют ферменты пентозофосфатного и гликолитического путей, путь Энтнера–Дудорова и фосфокетолазу (бифидобактериальный шунт). Они имеют полный набор ферментов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), включая обходные пути для некоторых реакций цикла, а также механизмы для восполнения C₄ интермедиатов (Fu et al., 2017; Khmelénina et al., 2019). Чрезвычайная гибкость метаболизма гаммапротеобактериальных метанотрофов предоставляет широкие возможности для управления потоками углерода на синтез нужных метаболитов. Представитель этого класса термотолерантный метанотроф *Methylococcus capsulatus* дополнительно ассимилирует CO₂ через цикл Кальвина, служит модельным организмом при изучении метанотрофии как способа питания микроорганизмов и используется для разработки процессов культивирования в промышленном масштабе (Overland et al., 2010). В 2013 году впервые

на примере галотолерантного *Methylovivimicrobium alcaliphilum* 20Z показана способность метанотрофов к ферментации формальдегида в условиях лимитирования роста кислородом и, как следствие, к накоплению в среде органических метаболитов (Kalyuzhnaya et al., 2013). Данная работа изменила представления о “токсичности” низкомолекулярных соединений для метанотрофов (Eccleston, Kelly, 1973) и послужила стимулом к более углубленному изучению метаболических путей трансформации метана. Поскольку галоалкалофильные метанотрофы демонстрируют устойчивый рост в широком диапазоне pH, солености, концентраций метанола, при низком парциальном давлении кислорода, а также проявляют повышенную устойчивость к загрязнению, они стали не только перспективными катализаторами биоконверсии метана, но и удобными объектами фундаментальных исследований. Метанотрофы с сериновым путем, будучи представлены как облигатными, так и факультативными формами по отношению к источнику углерода, имеют ряд преимуществ в качестве агентов биоремедиации и промышленной биотехнологии с использованием природного газа (Crombie, Murrell, 2011; Dunfield, Dedysh, 2014; Bordel et al., 2020).

СИСТЕМЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМОВ МЕТАНОТРОФОВ

Спонтанный мутагенез. По сравнению с традиционными объектами работ по геномному редактированию, такими, например, как *Escherichia coli* или *Corynebacterium*, манипуляции с метанотрофами существенно более длительны и трудоемки вследствие сложности культивирования этих бактерий. Первые работы по получению устойчивых к антибиотикам мутантов *Methylococcus* и *Methylo-tonas* основывались на использовании ультрафиолета или химических агентов (например, нитрозогуанидина, этилметансульфоната) (Harwood et al., 1972; Williams et al., 1977). Однако применение подхода спонтанного мутагенеза оказалось неэффективным, что объяснялось функционированием у метанотрофов высокоточных систем репарации ДНК. Однако впоследствии путем адаптивной лабораторной эволюции были получены штаммы, устойчивые к дихлорметану (Nicolaidis, Sargent, 1987) и рифамицину (Puri et al., 2015). Эти эксперименты продемонстрировали необходимость отработки подходящих методов скрининга и закрепления вносимых мутаций. Достаточно успешными оказались попытки транспозонного мутагенеза метанотрофов, которые завершились получением мутантов с делециями генов фиксации азота (Toukdarian, Lidstrom, 1984) или штаммов-продуцентов каротиноидов (Sharpe et al., 2007).

Двойная гомологичная рекомбинация. На сегодняшний день наиболее распространенным мето-

дом инактивации генов у метанотрофов является двойная гомологичная рекомбинация, сопровождаемая инсерцией кассеты устойчивости к антибиотикам, которая замещает ген-мишень (рис. 2а). Такая методология успешно применялась для *Mm. alcaliphilum* 20Z (Mustakhimov et al., 2010; Бут и соавт., 2013; Henard et al., 2018; But et al., 2020), *Ms. capsulatus* (Csaki et al., 2003; Henard et al., 2021), *Methylosinus trichosporium* OV3b (Stafford et al., 2003). Фрагменты ДНК, фланкирующие гены-мишени (“плечи” гена), клонируются в суицидальные (т.е. не реплицирующиеся в клетках реципиента) векторы рСМ184 или рК18mob, по этим фрагментам происходит рекомбинация.

Методы трансформации. Для доставки плазмид в клетки метанотрофов используются два основных метода – трансформация на основе конъюгации и трансформация на основе электропорации (Crombie, Murrell, 2011; Yan et al., 2016; Ro, Rosenzweig, 2018). Трансформацию с помощью конъюгации проводят посредством двухродительского скрещивания со штаммом *E. coli* S-17-1. Большое значение для генетических манипуляций имеет разработка эффективных методов электропорации с целью замены трудоемких методов конъюгации. Для повышения эффективности электропорации у метанотрофов, имеющих одновременно рММО и sММО, их выращивают на минеральной среде с пониженным содержанием CuSO_4 (<10 мкМ), определяющей пониженный уровень ВЦМ (Ro, Rosenzweig, 2018; Nguyen et al., 2019). В недавних исследованиях эффективность электропорации была повышена посредством оптимизации нескольких ключевых параметров, таких как подготовка компетентных клеток, условия электропорации, время восстановления и концентрация антибиотика (Hu et al., 2021). Основываясь на гомологичной рекомбинации и эффективной трансформации, делеция гена и экспрессия гетерологичного гена достигнуты одновременно путем прямой электропорации линейных фрагментов ДНК, полученных с помощью ПЦР. Использование этого подхода позволило сконструировать продуцент изобутиральдегида на основе *Mm. buryatense* 5GB1 путем замены эндогенного гена *fadE*, кодирующего ацил-КоА-дегидрогеназу, участвующую в расщеплении жирных кислот, гетерологичным геном декарбоксилазы 2-кетоионолериата *kivD* (Hu et al., 2021).

Направленный мутагенез может быть достигнут не только с помощью плазмид, но и линейных ПЦР-фрагментов, содержащих “плечи” гена-мишени и кассету устойчивости к антибиотикам. Это позволяет сократить время создания конструкций для генетического редактирования (Puri et al., 2015, 2016; Yan et al., 2016; Ro, Rosenzweig, 2018). В двухэтапной процедуре делетируемый из хромосомы ген сначала заменяется кассетой устойчивости к антибиотикам, которая затем удаляется с

помощью Cre рекомбиназы бактериофага P1 (Sternberg and Hamilton, 1981), выщепляющей маркерный ген, клонированный между сайтами связывания *loxP* (Marx, Lidstrom, 2002; Crombie, Murrell, 2011). Этим методом был получен мутант *Methylocella silvestris* BL2 по изоцитратлиаза, неспособный расти на C_1 -соединениях. Данная методика была также успешно применена для *Methylomonas* sp. ДН-1, при этом при высеве на агаризованную среду без антибиотика для оптимальной работы Cre рекомбиназы вносили 4 мМ NiCl_2 (Lee et al., 2021b).

Система безмаркерного аллельного обмена. Разработка протоколов контрселекции, не предполагающих повторного введения антибиотических маркеров, упрощает процесс получения множественных мутаций. Одним из эффективных методов редактирования геномов является использование гена *sacB* в качестве контрселектируемого маркера. Кодированная геном *sacB* левансахараза превращает сахарозу в леван, приводя к лизису клеток в присутствии определенной концентрации сахарозы (Recorbet et al., 1993). Метод успешно применялся для получения безмаркерных мутаций у метилотрофов (Marx, 2008). При этом редактирование проводится в два этапа. Сначала происходит встраивание плазмиды в хромосому по одному из гомологичных плечей, а затем при селекции на сахарозе может восстановиться аллель дикого типа или выщепиться целевой ген (рис. 2б). Этим методом с использованием плазмид, несущих ген *sacB*, у *Mm. buryatense* 5GB1 были инактивированы гены синтеза гликогена (Puri et al., 2015), а у *Mm. alcaliphilum* 20Z – нокаутированы одновременно два кластера генов синтеза и распада гликогена и ген *sps*, кодирующий сахарозофосфатсинтазу (Бут и соавт., 2020). Подавление синтеза гликогена у метанотрофов имеет практическое значение, поскольку они способны накапливать гликоген до 30% сухой массы клеток в условиях лимитирования роста азотом (Khmelenina et al., 1999; Ешинимаев и соавт., 2002), снижая эффективность преобразования углерода. Интересно, что при инактивации путей синтеза сахарозы и гликогена в клетках *Mm. alcaliphilum* увеличилось относительное содержание белка, но несколько снизилась скорость роста на метане. Таким образом, была показана принципиальная возможность относительно стабильного роста метанотрофа в отсутствие синтеза запасных соединений углерода.

Маркер *SacB* применялся при получении штаммов *Mm. alcaliphilum*, способных синтезировать 2,3-бутандиол, рассматриваемый в качестве биотоплива будущего (Nguyen et al., 2018), и пуртресцин (1,4-диаминобутана), используемый в фармацевтике и агрохимии (Nguyen, Lee, 2019), а также при конструировании пути биосинтеза

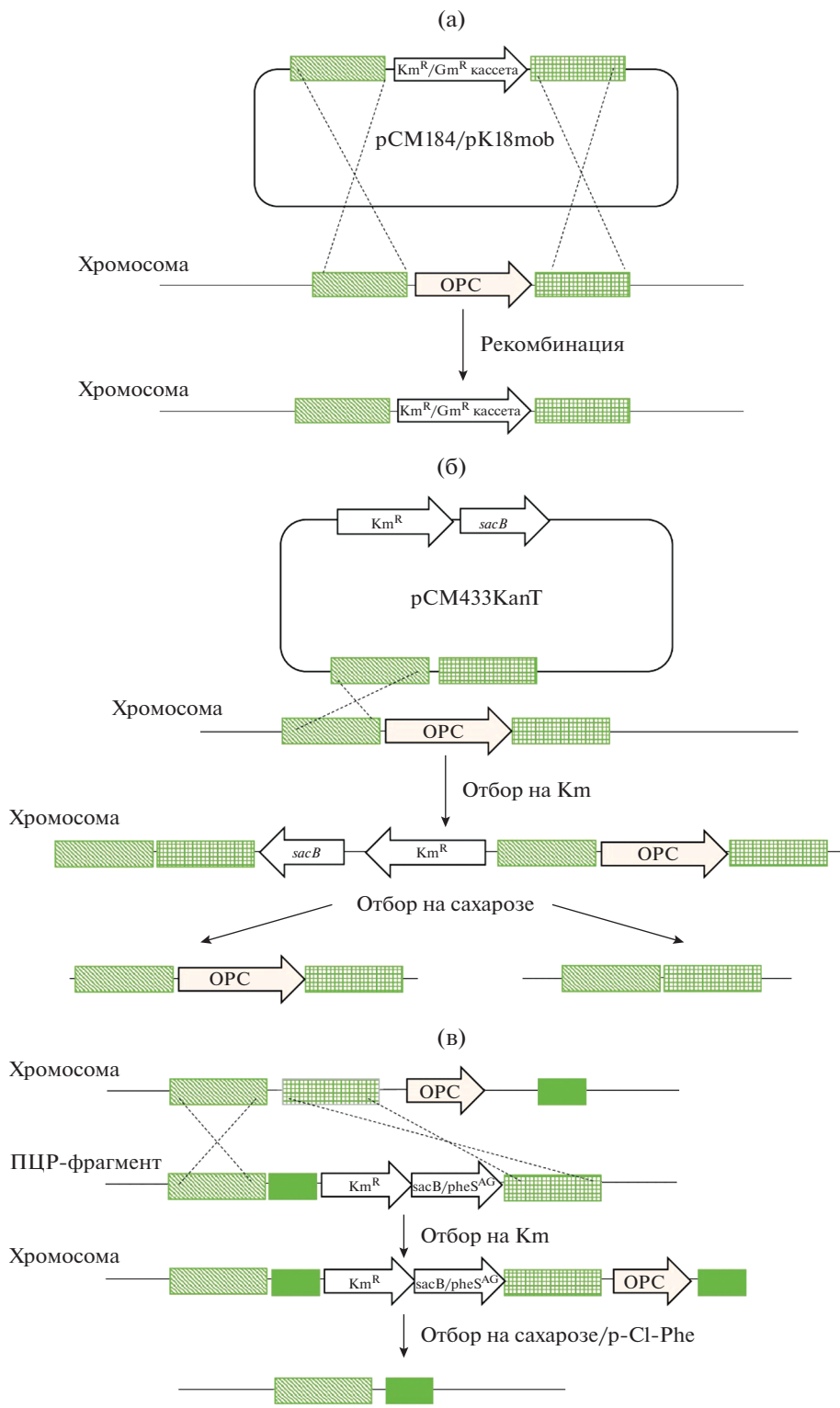


Рис. 2. Способы генетического редактирования метанотрофов (схемы внесения модификаций в хромосому метанотрофов): а – двойная гомологичная рекомбинация с использованием суицидальной плазмиды; б – использование плазмиды с геном контрелекции *sacB* для получения безмаркерных мутаций; в – использование ПЦР-фрагментов с генами контрелекции *sacB* или *pheSAG* для получения безмаркерных мутаций.

пигмента астаксантина у *Methylomonas* sp. 16a (Ye et al., 2007) и для скрининга двойных рекомбинантов у *Ms. trichosporium* OB3b при получении сайт-направленных мутаций в sMMO (Borodina et al., 2007). С использованием этого метода была изучена функция пентациклических тритерпеноидных липидов у метанотрофов. Было установлено, что 3-метилгопаноидметилаза участвует в стабилизации ВЦМ у *Ms. capsulatus* Bath (Welander, Summons, 2012).

В качестве маркера контрселекции используется также ген *pheS*, кодирующий α -субъединицу фенилаланил-тРНК-синтетазы. Введением двух точечных мутаций в ген *pheS* из *Ms. capsulatus* Bath получен вариант PheS^{AG}, который может включать в белки *p*-хлорфенилаланин, вызывая гибель клеток. Посредством отбора с помощью *p*-хлорфенилаланина был получен безмаркерный мутант *hoxF* с гораздо большей эффективностью, чем контрселекцией на основе SacB (Ishikawa et al., 2018). Варианты *pheS* использовались в метанотрофных штаммах-хозяевах, включая *Mm. buryatense* 5GB1C, *Mm. alcaliphilum* 20Z и *Methylomonas* sp. LW13 (Liu et al., 2020, 2021). Путем объединения PheS^{AG} и гена устойчивости к зеоцину была сконструирована позитивно-контрселективная кассета PZ (Liu et al., 2020). Стратегия, основанная на PZ и ПЦР (рис. 2б), была успешно использована при создании немаркированной делеции *glgA1* или всего оперона, кодирующего sMMO, в *Mm. buryatense* 5GB1C и *Mm. alcaliphilum* 20Z.

Система генетического редактирования CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats). В исследованиях последних лет высоко востребована система генетического редактирования, основанная на использовании эндонуклеазы Cas9, являющейся частью иммунной системы прокариот. Эта система позволяет с высокой специфичностью редактировать геномы как про-, так и эукариотических организмов. Эндонуклеаза Cas9 вносит двухцепочечный разрыв в нить ДНК, при этом таргетирование осуществляется с помощью так называемой “single guide” РНК (gRNA), содержащей протоспейсер из 20 п.н., комплементарный целевой последовательности, прилегающей к PAM (protospacer-adjacent motif) мотиву 5'-NGG-3'. Двухцепочечный разрыв может быть восстановлен с помощью специально выбранной “заплатки”, что позволяет ввести желаемые генетические модификации (Garneau et al., 2010; Gasiunas et al., 2012; Jinek et al., 2012). К настоящему времени, однако, выполнена лишь одна работа по редактированию геномов метанотрофов с помощью системы CRISPR/Cas9 (Tapscott et al., 2019). У *Ms. capsulatus* Bath была успешно внесена точечная мутация в ген гидроксилазного компонента sMMO на плазмиде, ген *tmoX* инактивирован в хромосоме введением в открытую

рамку считывания стоп-кодона, что нарушило функцию sMMO. При этом стоит отметить низкую эффективность модификации (2%), что, вероятно, обуславливает непопулярность данного подхода в отношении метанотрофов.

Плазмиды – ценный генетический инструмент, который можно применять для экспрессии нескольких копий гена и быстрого тестирования генетических конструкций. Репликоны широкого круга хозяев, которые были успешно использованы у метанотрофов, включают репликон RP4/RK2, определяющий группу несовместимости P (IncP) (Ali, Murrell, 2009), а также репликоны RSF1010 (IncQ) (Lloyd et al., 1999) и pBBR1 (Welander et al., 2012). На основе этих репликонов были сконструированы плазмиды pAWP78, pAWP79 и pAWP89, примененные для экспрессии гетерологичных белков и репортерных генов в *Ms. capsulatus* Bath (Ali, Murrell, 2009), *Methylomonas* sp. 16a, DH-1 (Sharpe et al., 2007), *Ms. trichosporium* OB3b (Lloyd et al., 1999), *Mm. buryatense* 5GB1C (Puri et al., 2015) и *Mm. alcaliphilum* 20Z (Pham et al., 2022). При этом векторы pAWP79 и pAWP89 получили широкое распространение и стали универсальными для различных групп метанотрофов (табл. 1; Nguyen et al., 2019, 2020a, 2020b), а pAWP78 стал основой для создания вектора pCAN01, используемого для контролируемой экспрессии генов (Henard et al., 2016). Экспрессируемый ген в pCAN01 находится под контролем тетрациклинового репрессора/оператора. Репрессия гена снимается при добавлении ангидротетрациклина – аналога тетрациклина, не обладающего антибиотической активностью (Henard et al., 2010).

Недавно у *Methylomonas* sp. DH-1 была обнаружена цитозинметилтрансфераза, которая помогает чужеродным плазмидам обходить систему рестрикции–модификации (PM) (Ren et al., 2020), что приводит к более высокой эффективности трансформации. Цитозинметилтрансфераза распознает последовательность GGCC для метилирования. Ген, кодирующий цитозинметилтрансферазу *Methylomonas* sp. DH-1, был введен в *E. coli* JM110 с дефицитом генов метилазы *dam* и *dcm*, тем самым была создана синтетическая система PM. Кишечная палочка, экспрессирующая цитозинметилтрансферазу, метилировала чужеродные плазмиды, которые после выделения из *E. coli* JM110 показали повышенную эффективность трансформации в *Methylomonas* sp. DH-1 по сравнению с неметилированными плазмидами. С использованием этого подхода в клетках *Methylomonas* sp. DH-1, трансформированных плазмидами, несущими гены синтеза каротиноидов, продукция пигмента была увеличена на 26% (Ren et al., 2020).

В бактериальной биотехнологии для генетических манипуляций или физиологических модификаций возможно доставлять функциональные

Таблица 1. Примеры применения методов редактирования геномов для метанотрофных бактерий и достигнутые результаты

Генетические инструменты	Метанотроф	Цель манипуляций	Результат	Ссылка
CRISPR/Cas9	<i>Methylococcus capsulatus</i>	Введение стоп-кодона в открытую рамку считывания гена <i>mmoX</i>	Инактивация растворимой метанмонооксигеназы (sMMO)	Tarpscott et al., 2019
Безмаркерный мутагенез				
<i>pheS^{ΔG}</i>	<i>Ms. capsulatus</i> (Bath)	Делеция гена <i>hoxF</i> Инактивация La^{2+} -зависимой метанолдегидрогеназы <i>Hox</i>	Создание нового метода контрелекции для <i>Ms. capsulatus</i> с использованием <i>pheS^{ΔG}</i>	Ishikawa et al., 2018
	<i>Mm. buryatense</i> 5GB1C <i>Mm. alcaliphilum</i> 20Z	Делеция 10-т.п.н. <i>ymto</i> оперона, кодирующего sMMO. Выключение гена гликогенсинтазы Выключение гена гликогенсинтазы	Создание нового метода контрелекции для <i>Mm. buryatense</i> и <i>Mm. alcaliphilum</i> с использованием <i>pheS^{ΔG}</i>	Liu et al., 2020
<i>sacB</i>	<i>Ms. capsulatus</i> Bath	Делеция гена <i>hpnR</i> , кодирующего метилазу гопаиноидов	Выяснение роли метилгопаиноидов в стабилизации мембран	Welander, Summons, 2012
	<i>Mm. buryatense</i> 5GB1C	Инсерция <i>PmxaF</i> -хуIE в хромосому	Доказательство репрессии гена <i>mxaF</i> редкодземельными металлами	Chu, Lidstrom, 2016
<i>Mm. buryatense</i> 5GB1C <i>Methylomonas</i> sp. LW13 <i>Methylobacter tundripaludum</i> 21/22	<i>Mm. buryatense</i> 5GB1C <i>Methylomonas</i> sp. LW13 <i>Methylobacter tundripaludum</i> 21/22	Δ glgA1, Δ mmoD, Δ sMMO Делеция генов гликогенсинтазы (<i>glgA1</i>), регулятора экспрессии rMMO (<i>mmoD</i>) и локуса, кодирующего гена rMMO (~10 т.п.н.)	Разработка протоколов метаболической инженерии метанотрофов типа I на основе электропорации, контрелекции <i>sacB</i> или сайт-специфической рекомбинации FLP-FRT	Yan et al., 2016
		Δ spsAglg Делеция кластера генов синтеза и распада гликогена и сахаразы	Получение штамма, не синтезирующего гликоген и сахарозу	Бут с соавт., 2020
<i>Mm. alcaliphilum</i> 20Z	<i>Mm. alcaliphilum</i> 20Z	Δ ldh Δ ack Δ spreE1::argDJ Выключение генов <i>ldh</i> лактадегидрогеназы и ацетаткиназы <i>ack</i> , замена гена спермидинсинтазы <i>spe</i> на ацетилорнитин-аминотрансферазу <i>argD</i> и орнитинацилтрансферазу <i>argJ</i>	Создание штамма, способного к синтезу путресцина	Nguyen, Lee, 2019
		Δ ldh Δ amdh Δ ack Тройной мутант по генам лактадегидрогеназы, ацетаткиназы и малалдегидрогеназы	Повышение уровня биосинтеза 2,3-бутандиола	Nguyen et al., 2018

Таблица 1. Продолжение

Генетические инструменты	Метанотроф	Цель манипуляций	Результат	Ссылка
Flp-рекомбиназа	<i>Mm. buryatense</i> 5GB1C	Делеция генов <i>хохF</i> , <i>mxhF</i> , <i>mxhI</i> с помощью ПЦР-фрагмента с зондиновой кассетой с последующим выщеплением последней с помощью Flp-рекомбиназы	Показана преобладающая функция La^{3+} -зависимой ХохF-МДГ по сравнению с Ca^{2+} -зависимой МххF-МДГ у <i>Mm. buryatense</i>	Chu, Lidstrom, 2016
		$\Delta mxaY$	Установлена функция гистидкиназы MxaY в качестве регулятора транскрипции генов метанодегидрогеназы MxaFI	Chu et al., 2016
Маркерные модификации				
pCM184 (Km)	<i>Methylothermus</i> sp. ДН-1	Делеция гена сукцинатадегидрогеназы <i>sdh</i>	Получение штамма, синтезирующего сукцинат	Nguyen et al., 2019
pCM184 (Gm)	<i>Mm. alcaliphilum</i> 20Z	$\Delta rhd::Gm^R$. Делеция пируватдегидрогеназы	Получение штамма, синтезирующего лактат	Henard et al., 2016
	<i>Ms. capsulatus</i> Bath	Δruc , Δsga , Δgcv Делеция пируваткарбоксылазы, серингли-оксилатаминотрансферазы, фермента расщепления глицина	Новые знания о роли цикла Кальвина в метаболизме метанотрофов X типа	Henard et al., 2021
pAWP89	<i>Methylothermus</i> sp. DS(Δsdh)	Внесение генов глиоксилатного шунта из <i>E. coli</i> MG1655 под контролем P _{mxhF} промотора	Увеличение продукции сукцината из метана	Nguyen et al., 2019
	<i>Mm. alcaliphilum</i> 20Z	P _{tet} :: <i>asbF-aroY-catA</i> внесение на плазмиде дегидрошикиматдегидратазы (<i>asbF</i>) из <i>Bacillus thuringensis</i> , протокатазуатдекарбоксылазу (<i>aroY</i>) из <i>Enterobacter cloacae</i> и катехолиоксигеназы (<i>catA</i>) из <i>Acinetobacter baylyi</i>	Получение штамма, синтезирующего муконовую кислоту	Henard et al., 2019
		P _{tac} :: <i>glpFKDgspA</i> Экспрессия НАД-зависимой глицеролдегидрогеназы (<i>glpA</i>), дигидроксиацетонкиназы (<i>glpK</i>), транспортера глицерина (<i>glpF</i>) из <i>E. coli</i> и гомологичной глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (<i>gpsA</i>)	Получение штамма, растущего на глицерине	Le et al., 2021

Таблица 1. Продолжение

Генетические инструменты	Метанотроф	Цель манипуляций	Результат	Ссылка
pAWP89	<i>Mt. alcaliphilum</i> 20Z	Внесение единым опероном генов триптофаназы (<i>tna</i>) из <i>E. coli</i> и флавиносодержащей монооксигеназы (<i>fmo</i>) из <i>Methylophilaga aminisulfidivorans</i> , <i>AroG</i> ^{fbt(D146N)} и <i>TrpE</i> ^{fbt(S40F)} из <i>E. coli</i>	Синтез красителя индиго	Pham et al., 2022
		Внесение единым опероном генов <i>afs</i> , <i>ispA</i> и оптимизированного pDXP пути (<i>ribB-DSAG-dxr</i>)	Синтез α -фарнезина	
	<i>Mt. alcaliphilum</i> 20Z XYL	<i>P_{tac}::zss1-ispA-dxs-ispG-zwf-pgd</i>	Синтез α -гумулена	Nguyen et al., 2020b
		Внесение на плазмиде гумуленсинтазы (<i>zss1</i>), фарнезилпирофосфатасинтазы (<i>ispA</i>), 1-дезоксисилулозо-5-фосфатасинтазы (<i>dxs</i>), гидроксиметилбутенилдифосфатасинтазы (<i>ispG</i>), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (<i>zwf</i>), фосфоглюконатдегидрогеназы (<i>pgd</i>)		
	<i>Mt. alcaliphilum</i> 20Z XYL	Внесение на плазмиде кластера <i>bidABC</i> из <i>Klebsiella pneumoniae</i> , кодирующего ацетолактадекарбокксилазу, ацетолактагсиназу и ацетоинредуктазу, под контролем <i>P_{tac}</i> промотора в штамм метанотрофа, растущий на ксилозе	Синтез 2,3-бутандиола	Nguyen et al., 2021
		Внесение на плазмиде 2-диметил-4-деоксигалузолсинтазы, O-метилтрансферазы, АТФ-лигазы, аланин-аланин лигазы и транскетаолы из <i>Nostoc punctiforme</i> под контролем <i>P_{tac}</i> промотора в штамм метанотрофа, растущий на ксилозе	Синтез шинорина	

Таблица 1. Продолжение

Генетические инструменты	Метанотроф	Цель манипуляций	Результат	Ссылка
pAWP89	<i>Mm. alcaliphilum</i> 20Z XYU	Ptac::phdphaΔBtesB Внесение на плазмиде генов тиолазы (<i>phaA</i>), ацетоацетил КоА редуктазы (<i>phaB</i>) из <i>Ralstonia eutropha</i> H16, тиоэстеразы (<i>tesB</i>) из <i>E. coli</i> и нативной пируватдегидрогеназы <i>Mm. alcaliphilum</i> 20Z под контролем P _{tas} промотора в штамм, растущий на ксилозе	Синтез 3-гидроксибутирата	Nguyen et al., 2021
	<i>Mm. alcaliphilum</i> 20ZE4A (Δ <i>ldh</i> Δ <i>ack</i> Δ <i>speE</i> 1::argDJ)	Внесение на плазмиде pAWP89 под контролем P _{tas} промотора гена орнитиндекарбоксилазы <i>speF</i> из <i>Ms. trichosporium</i> OB3b	Усиление синтеза путресцина	Nguyen, Lee, 2019
	<i>Mm. alcaliphilum</i> 20ZM3 (Δ <i>ldh</i> Δ <i>mdh</i> Δ <i>ack</i>)	Внесение на плазмиде гена <i>budA</i> из <i>Klebsiella pneumoniae</i> и <i>budB</i> из <i>Bacillus subtilis</i> под контролем P _{tas} промотора	Синтез 2,3-бутандиола	Nguyen et al., 2018
	<i>Ms. trichosporium</i> OB3b	P _{tas} ::mcs-mms- <i>perc</i> Внесение на плазмиде малонил-КоА редуктазы (<i>mcr</i>) из <i>Chloroflexus aurantiacus</i> , метил-малонил-КоА карбоксилтрансферазы (<i>mms</i>) из <i>Propionibacterium freudenreichii</i> и гомологичной ФЕП карбоксилазы (<i>perc</i>)	Синтез 3-гидроксипропионовой кислоты	Nguyen et al., 2020a
pCAN01	<i>Mm. buryatense</i> 5GB1C	Внесение гена лактатдегидрогеназы (<i>ldh</i>) из <i>Lactobacillus helveticus</i> под контролем тетрациклинового промотора	Индукцируемый синтез лактата	Henard, Guarnieri, 2016
pAWP87	<i>M. buryatense</i> 5GB1C	P _{mxaF} ::synthetic RBS::atoB-hbd- <i>src-ydiI</i> Внесение на плазмиде генов тиолазы (<i>atoB</i>), 3-гидроксиацил-КоА дегидрогеназы (<i>hdb</i>), тиоэстеразы (<i>ydiI</i>) из <i>E. coli</i> , еноил-КоА гидратаза из <i>Clostridium acetobutylicum</i>	Синтез кротоновой кислоты	Garg et al., 2018
pK18mobSacB	<i>Ms. trichosporium</i> OB3b	<i>mxaF</i> ::Gm ^r	Изучение регуляции экспрессии Хох-МДГ и Мха-МДГ	Haque et al., 2016

Таблица 1. Окончание

Генетические инструменты	Метанотроф	Цель манипуляций	Результат	Ссылка
ПРЦ-фрагмент	<i>Mm. burgatense</i> 5GB1C	<p>ΔglgA1::Km^R, ΔmmoD::Km^R, ΔsMMO::Km^R</p> <p>Замена генов гликогенсинтазы (<i>glgA1</i>), регулятора экспрессии sMMO (<i>mmoD</i>) или локуса, кодирующего ген рММО (~10 т.п.н.) на кананициновую кассету</p> <p>Δsga, ΔfumA, ΔfumC, ΔlprD, ΔlactC, Δkoq, ΔlprDΔlactC</p> <p>Делеция серин-глиоксилатаминотрансферазы (<i>sga</i>), фумараз (<i>fumA</i>, <i>fumC</i>), 2-альфа-кетоглутаратдегидрогеназы (<i>lprD</i>), альфа-кетоглутаратдекарбоксилазы (<i>akdc</i>), альфа-кетоглутаратферридоксиноксидоредуктазы (<i>kor</i>)</p>	Создание метода контрселекции	Yan et al., 2016
	<i>Methylothermus</i> sp. LW13	<p>ΔхоxF::Km^R, ΔхоxG::Km^R, ΔмхaF::Km^R, ΔхоxG::Km^R</p> <p>Делеция структурных генов метанолдегидрогеназ ХоxF и МхaF и цитохрома ХоxG(4)</p>	Изучение функции генов	Fu et al., 2017
pCM351-glgA (Gm)	<i>Mm. alcaliphilum</i> 20Z	<p>Pтac::xylA^{trpE}</p> <p>Ведение генов утилизации ксилозы в <i>glgA</i> локус хромосомы: ксилоизомеразы (<i>xyIA</i>) и ксилозокиназы (<i>xyIB</i>), а также рибулозо-фосфат-3-эпимеразы из <i>E. coli</i> (<i>rpe</i>) под контролем Pтac промотора</p>	Выявление функции цитохрома ХоxG(4) в метаболизме метанотропоф	Zheng et al., 2018
	<i>Mm. alcaliphilum</i> 20Z	<p>Замена <i>glgA1</i> кластером <i>bioAABC</i> из <i>Klebsiella pneumoniae</i> под контролем Pтac промотора в штамм, растущий на глищерине за счет экспрессии кластера Pтac::glpFKDgsrA</p>	Получение штамма метанотропофа, растущего на ксилозе	Nguyen et al., 2021
			Синтез 2,3-бутандиола	Le et al., 2021

белки в клетки с использованием пептидов в качестве переносчиков. Библиотеку проникающих в клетку пептидов и метод доставки белков, конъюгированных с пептидами, тестировали, вырезая маркерный ген в *Methylobionas* sp. DH-1 (Lie et al., 2021). Предложенная библиотека проверена на отсутствие значительной цитотоксичности проникающих пептидов в отношении *E. coli*.

Элиминация нативной плазмиды у *Mm. buryatense* 5GB1. Системы экспрессии генов на основе плазмид позволяют быстро тестировать несколько генетических конструкций. Ранее для манипулирования штаммами метанотрофных метилотрофов была разработана система с использованием плазмиды широкого круга хозяев pCM66 на основе IncP размером 7.6 т.п.н. (Marx, Lidstrom, 2001). Однако исходный штамм *Mm. buryatense* 5GB1 содержит плазмиду размером 80 т.п.н., несущую функции стабильности и поддержания, которые приводят к несовместимости между плазмидами. Элиминация нативной плазмиды была проведена путем введения IncP-плазмиды pVK100 и последующим избавлением от нее с помощью пересевов без антибиотика (Puru et al., 2015). Как результат, получены штаммы *Mm. buryatense* 5GB1S и 5GB1C, которые способны конъюгировать с малыми векторами и поддаются современным методам клонирования.

Библиотеки промоторов для экспрессии генов метанотрофов и репортерные гены. В метаболической инженерии сверхэкспрессия генов может не привести к увеличению выхода продукции, поскольку клеточные ресурсы расходуются чрезмерно на синтез белка, что приводит к снижению ростовых параметров. Кроме того, неоптимизированная экспрессия генов может способствовать накоплению токсичных промежуточных метаболитов, что снизит выход продукции. Для тонкой настройки уровней экспрессии генов используются промоторы различной силы.

Для поиска подходящих промоторов, обеспечивающих конститутивную или регулируемую экспрессию целевых генов, используются репортерные белки. Применение канонических флуоресцирующих белков (таких как GFP, dTomato) считалось неэффективным способом оценки силы промоторов у метанотрофов вследствие наличия у них обширной сети ВЦМ и/или S-слоев на поверхности клеток. Трудоемкость оценки флуоресценции в клеточных экстрактах сводит на нет преимущество в использовании репортерных генов (Ali, Murrell, 2009; Puru et al., 2015). Для определения силы промоторов у *Methylobionas* sp. DH-1 тандем промотор-*gfp* был интегрирован в некодирующую область генома, а флуоресценцию тестировали методом проточной цитометрии (Lee et al., 2021a). У *Mm. buryatense* 5GB1S эндогенные промоторы, управляющие экспрессией гена метанолдегидро-

геназы *mxaF* и сигма-факторов *rpoD*, были протестированы с помощью красного флуоресцентного белка dTomato в качестве репортера (Shaner et al., 2004). Обнаружено, что промотор гена *mxaF* неактивен в *E. coli*, хотя это был самый сильный из протестированных промоторов в *Mm. buryatense*. Наряду с генами флуоресцирующих белков, с этой целью применяются гены катехол-2,3-диоксигеназы *xylE* и β -галактозидазы *lacZ* (Ali, Murrell, 2009). Силу промоторов ключевых генов у *Mm. alcaliphilum* 20Z тестировали в штамме метанотрофа, дефектном по глюкокиназе (Мустахимов и соавт., 2016). Ген, кодирующий глюкокиназу, вносили на плазмиде под контролем тестируемых промоторов, индикатором уровня экспрессии с промотора служила активность глюкокиназы в бесклеточных экстрактах. Это исследование подтвердило высокую активность промотора гена метанолдегидрогеназы *mxaF* в метанотрофных бактериях.

Оценка уровней экспрессии генов у *Mm. buryatense* 5GB1 недавно была проведена с помощью наборов данных RNA-seq (Wilson, 2021). Штамм культивировали в различных условиях и анализировали данные секвенирования РНК. Была идентифицирована группа генов с высокой экспрессией и выявлены соответствующие промоторные области-кандидаты. Проверку предполагаемых промоторов проводили с использованием репортера XylE.

Другой подход применяли при выборе оптимальных промоторов для производства кадаверина в *Methylobionas* sp. DH-1 (Lee et al., 2021). Были проанализированы участки 100 п.н. выше сайта начала транскрипции всех генов, кроме гипотетических белков. Параллельно у *Methylobionas* sp. DH-1 идентифицировали высоко экспрессируемые белки с помощью 2D-гель-электрофореза и MALDI-TOF. В результате была получена библиотека из 38 промоторов и проверена с использованием *gfp*. Основываясь на полученных данных, была проведена гетерологичная экспрессия генов *cadA* и *cadB* в *Methylobionas* sp. DH-1. Титр кадаверина достиг наивысшего значения 18.12 мг/л в штамме, экспрессирующем гены *cadA* и *cadB* под промотором, соответственно, рибосомного белка RpmB (L28) и белка-инициатора репликации DnaA.

Модификация метаболизма с целью получения целевого продукта. Внесением на плазмиде pCAN01 гена лактатдегидрогеназы из *Lactobacillus helveticus* в клетки *Mm. buryatense* был получен штамм, который выделял в среду лактат в концентрации 800 мг/л (Henard et al., 2016). Существенный вклад в выход целевого продукта вносит также настройка трансляции генов, т.е. подбор наилучших рибосом-связывающих последовательностей (RBS). Следует отметить, что

использование определенного RBS может быть удачным в одном окружении (т.е. с определенным протомотором и геном) и неэффективным в другом. Оптимальный дизайн RBS разрабатывали с помощью программы RBS калькулятор 2.0 (Salis et al., 2009; Espah Borujeni et al., 2014), что позволило значительно увеличить выход лактата у *Mm. buryatense* 5GB1C (Garg et al., 2018), а также шинорина у *Mm. alcaliphilum* 20Z (Nguyen et al., 2021). Примечательно, что выход шинорина при использовании сконструированного метанотрофного биокатализатора был сопоставим с таковыми у промышленных продуцентов.

Протестирована способность *Mm. buryatense* синтезировать кротоновую кислоту (выход 50 мг/л) путем внесения генов обратного пути β -окисления из *E. coli* MG1655 с помощью плазмидного вектора (Garg et al., 2018). Для успешного результата при модификации метанотрофов часто используют кодон-оптимизированные гены (Pham et al., 2022b). Для модификации *Mm. alcaliphilum* с целью получения путресцина, в штамм с делецией генов лактатдегидрогеназы, ацетаткиназы и спермидинсинтазы на плазмиде pAWP89 под *tac* промотором были внесены кодон-оптимизированные гены ацетилорнитинаминотрансферазы *argD* и орнитинацилтрансферазы *argJ* из *Ms. trichosporium* OB3b, а также ген орнитиндекарбоксилазы *speC*. В результате удалось достичь концентрации путресцина 98.08 мг/л (Nguyen et al., 2019). Благодаря использованию кодон-оптимизированных генов триптофаназы *tna* из *E. coli* и флавинодержающей монооксигеназы *fmo* из *Methylophaga aminisulfidivorans*, на основе *Mm. alcaliphilum* был получен продуцент пигмента индиго (3.9 мкг/л). После внесения генов ксилосоизомеразы (*xylA*) и ксилулокиназы (*xylB*) из *E. coli* стал возможен миксотрофный рост *Mm. alcaliphilum* в среде с добавлением 2 г/л ксилозы, что увеличило выход красителя до 6.3 мкг/л (Pham et al., 2022b).

Среди нейтрофильных негалофильных метанотрофов наиболее податливыми к модификациям оказались представители рода *Methylomonas*. Так, замена гена сукцинатдегидрогеназы (*sdh*) у *Methylomonas* sp. DH-1 на канамициновую кассету привела к накоплению в среде сукцината, а введение на плазмиде pAWP89 генов гликоксилатного шунта позволило увеличить выход сукцината до 134 мг/л (Nguyen et al., 2019). Попытки перенаправить поток углерода посредством выключения генов ацетаткиназы (*ack*) и фосфоацетилтрансферазы (*pta*) или пируват-формиатлиазы (*pfl*) не привели к увеличению выхода сукцината.

Метаболическое моделирование. Еще одним современным подходом, активно используемым в исследованиях молекулярных основ метано- и метилотрофии, является метаболическое моделирование. Моделирование метаболических пу-

тей позволяет прогнозировать направление потока углерода при генетической модификации, конструировать новые пути, ведущие к синтезу нужного продукта, а также предсказывать влияние окружающей среды или генетических манипуляций на поведение системы. На сегодняшний день метаболические модели разработаны для *Mm. buryatense* 5GB1 (de la Torre et al., 2015), *Ms. capsulatus* Bath (Lieven et al., 2018), *Mm. alcaliphilum* 20Z (Akberdin et al., 2018) и *Ms. trichosporium* OB3b (Naizabekov, Lee, 2020). Интересно, что модели для *Methylotheobacterium* и *Methylococcus* предполагают значительные различия в механизмах переноса электронов. Метаболическое моделирование необходимо для прогнозирования фенотипов *in silico*, что может определять стратегии биоинженерии.

Совместное выращивание на метане и полиуглеродных субстратах. Большинство метанотрофов не могут использовать полиуглеродные субстраты и имеют относительно низкую скорость роста на метане ввиду низкой растворимости CH_4 . Кроме того, для монооксигенирования инертной молекулы метана нужны восстановительные эквиваленты. Использование полиуглеродного соединения в качестве ко-субстрата представляется многообещающей стратегией при производстве целевых продуктов. Первая попытка демонстрации способности гаммапротеобактериального метанотрофа к использованию для роста сахаров была осуществлена введением в *Mm. alcaliphilum* 20Z ксилосоизомеразы (*xylA*) и ксилулокиназы (*xylB*) из *E. coli* наряду со сверхэкспрессией собственной рибулозофосфат-3-эпимеразы (*rpe*) (Nguyen et al., 2021). Сконструированный штамм мог расти на ксилозе как на единственном источнике углерода, но с довольно продолжительной лаг-фазой. Скорость роста модифицированного штамма на метане с ксилозой была в 1.5 раза выше по сравнению со скоростью роста только на метане, а продукция шинорина (производное седогептулозо-7-фосфата) возросла в 2.3 раза. Кроме того, синтез 2,3-бутандиола, ацетоина и 3-гидроксимасляной кислоты значительно усиливался при росте в среде, содержащей метан и ксилозу.

В *Mm. alcaliphilum* 20Z были введены гены, ответственные за утилизацию глицерина, включая транспортер глицерина (*glpF*), глицеролкиназу (*glpK*) и эндогенную глицерол-3-фосфатдегидрогеназу (*gpsA*) (Lee et al., 2021). Сконструированный штамм рос на глицерине при низкой концентрации 0.1%, но эта способность была улучшена адаптивной эволюцией. Глицерин, как дополнительный к метану источник углерода, в 2 раза увеличивал скорость роста и в 3.9 раза продукцию 2,3-бутандиола. Поскольку метаболизм глицерина обеспечивает синтез дополнительного НАДН, метанотроф при миксотрофном росте может конвертировать метан в метанол без добавления фор-

миата в качестве донора электронов. Биокатализатор для превращения метана в метанол, работающий без ингибиторов метанолдегидрогеназы (хлорида аммония, этилендиаминтетраацетатного или фосфатного буфера) можно создать на основе мутанта с дефицитом метанолдегидрогеназы (Hur et al., 2017; Patel et al., 2020). Новая концепция одностадийной биоконверсии метана в метанол в метанотрофных бактериях с использованием глицерина в качестве восстановительной силы может быть расширена для превращения других алканов в соответствующие им первичные спирты.

Применение метанотрофов в агротехнологиях.

Одним из примеров в этой области исследований является сконструированный штамм *Methylobionas* sp. LW13, способный разлагать широко используемый гербицид бенсульфурон-метил (БСМ) (Liu et al., 2021). Для этого в *Methylobionas* sp. LW13 была экспрессирована гидролаза SulE из *Hanschlegelia zhihuaiae* S113 под промотором P_{tac} с помощью стратегии безмаркерного гена на основе p-CI-Phe. Фермент дезэтерифицирует БСМ до бенсульфурановой кислоты и метанола. Сконструированный штамм полностью конвертировал 40 мг/л БСМ в бенсульфурановую кислоту через 96 ч.

Метанотрофы в природе не синтезируют фитогормоны. Тем не менее, связь между растениями и метанотрофами подтверждена многочисленными наблюдениями (Hanson, Hanson, 1996; Bosse, Frenzel, 1997; Davamani et al., 2020). В частности, интродукция метанотрофных бактерий была успешно использована для снижения выбросов метана в атмосферу из затопляемых рисовых чеков (Davamani et al., 2020). Задача создания метанотрофных бактерий, обладающих способностью синтезировать фитогормоны для стимуляции роста растений и для снижения эмиссии метана, была реализована на примере *Mm. alcaliphilum* 20Z (Pham et al., 2022c). L-триптофан, незаменимая для живых организмов аминокислота, синтезируется из фосфоенолпирувата и эритрозо-4-фосфата — центральных интермедиатов гликолиза — доминирующего пути распада фосфосахаров у метанотрофов с РМФ циклом ассимиляции углерода. Триптофан также является предшественником ауксина (индолил-3-уксусной кислоты, ИУК). Гетерологичной экспрессией в *Mm. alcaliphilum* 20Z ферментов синтеза триптофана из *E. coli*, устойчивых к ингибированию по принципу обратной связи, получен штамм-продуцент триптофана. Дополнительным введением генов, кодирующих ферменты синтеза ИУК, сконструирован рекомбинантный штамм, синтезирующий ауксин и способный стимулировать прорастание семян, длину побегов и длину корней пшеницы на ранней стадии роста в засоленных щелочных условиях (Pham et al., 2022b). Таким образом,

предложен подход для создания метанотрофов, способных повысить продуктивность и рост растений и одновременно сократить выбросы метана, образующегося в результате сельскохозяйственной деятельности.

ВЫВОДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Последнее десятилетие продемонстрировало быстрое развитие генетических инструментов и их адаптацию для применения в работе с метанотрофными бактериями. Секвенирование геномов, многочисленные примеры успешной геномной инженерии в сочетании с быстро растущим пониманием фундаментального метаболизма метанотрофов дают надежду на реализацию, по крайней мере, ряда рациональных стратегий направленной модификации этих уникальных бактерий. Это относительно новая область исследований для метанотрофных бактерий; все еще существует потребность в более глубоких исследованиях, нацеленных на устранение таких ограничений, как низкий поток углерода к целевым продуктам, эффективность окисления метана и уровни экспрессии ключевых ферментов. В данном обзоре не были представлены примеры работ по синтетической биологии — преобразование метана неметанотрофными микроорганизмами, что также может внести значительный вклад в повышение эффективности производства и выхода целевых продуктов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Обзор подготовлен в рамках выполнения проекта “Развитие технологий геномного редактирования для решения инновационных задач промышленных и пищевых биотехнологий” № 075-15-2021-1071, финансируемого Министерством науки и высшего образования Российской Федерации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящий обзор не содержит сведений о результатах исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бут С.Ю., Дедыш С.Н., Попов В.О., Пименов Н.В., Хмеленина В.Н. Конструирование метанотрофа I типа с пониженной способностью аккумулировать гликоген и сахарозу // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. С. 465–471.

- But S.Yu., Dedysh S.N., Popov V.O., Pimenov N.V., Khmelena V.N. Construction of a Type-I methanotroph with reduced capacity for glycogen and sucrose accumulation // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. V. 56. P. 538–543.
- Бут С.Ю., Егорова С.В., Хмеленина В.Н., Троценко Ю.А. Биохимические свойства и филогения гидроксипируватредуктаз метанотрофных бактерий, реализующих различные пути C1 ассимиляции // Биохимия. 2017. Т. 82. С. 1647–1656.
- But S.Y., Egorova S.V., Khmelena V.N., Trotsenko Y.A. Biochemical properties and phylogeny of hydroxypyruvate reductases from methanotrophic bacteria with different C1-assimilation pathways // Biochemistry (Moscow). 2017. V. 82. P. 1295–1303.
- Гальченко В.Ф. Метанотрофные бактерии. М.: ГЕОС, 2001. 500 с.
- Григорян А.Н., Горская Л. Использование природного газа для микробиологического синтеза. М.: ОНТИ Микробиопром, 1970. 90 с.
- Егоров И., Купина Л., Аксюк И., Муртазаева Р. Гаприн – источник белка // Птицеводство. 1990. Т. 8. С. 25–27.
- Ешинимавев Б.И., Хмеленина В.Н., Сахаровский В.Г., Сузина Н.Е., Троценко Ю.А. Физиолого-биохимические и цитологические особенности галоалкалол-ерантного метанотрофа при росте на метаноле // Микробиология. 2002. Т. 71. С. 690–700.
- Eshinimaev B.T., Khmelena V.N., Sakharovskii V.G., Suzina N.E., Trotsenko Y.A. Physiological, biochemical, and cytological characteristics of a haloalkaliphilic methanotroph grown on methanol // Microbiology (Moscow). 2002. V. 71. P. 512–518.
- Лалов В.В. Анализ и синтез энерготехнологических систем производства кормового белка из природного газа. Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Москва, 1991.
- Мустахимов И.И., Бут С.Ю., Решетников А.С., Хмеленина В.Н., Троценко Ю.А. Использование гомо- и гетерологичных репортерных белков для оценки активности промоторов у *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z // Прикл. биохимия и микробиология. 2016. Т. 52. С. 279–286.
- Mustakhimov I.I., But S.Y., Reshetnikov A.S., Khmelena V.N., Trotsenko Y.A. Homo- and heterologous reporter proteins for evaluation of promoter activity in *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z // Appl. Biochem. Microbiol. 2016. V. 52. P. 279–286.
- Akberdin I.R., Thompson M., Hamilton R., Desai N., Alexander D., Henard C.A., Guarnieri M.T., Kalyuzhnaya M.G. Methane utilization in *Methylomicrobium alcaliphilum* 20ZR: a systems approach // Sci. Rep. 2018. V. 8. Art. 2512.
- Ali H., Murrell J.C. Development and validation of promoter-probe vectors for the study of methane monooxygenase gene expression in *Methylococcus capsulatus* Bath // Microbiology (SGM. Reading, Engl.). 2009. V. 155. P. 761–771.
- Bordel S., Crombie A.T., Muñoz R., Murrell J.C. Genome Scale Metabolic Model of the versatile methanotroph *Methylocella silvestris* // Microb. Cell Fact. 2020. V. 19. P. 144.
- Borodina E., Nichol T., Dumont M.G., Smith T.J., Murrell J.C. Mutagenesis of the “leucine gate” to explore the basis of catalytic versatility in soluble methane monooxygenase // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. P. 6460–6467.
- Bosse U., Frenzel P. Activity and distribution of methane-oxidizing bacteria in flooded rice soil microcosms and in rice plants (*Oryza sativa*) // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. P. 1199–1207.
- Bothe H., Moller Jensen K., Mergel A., Larsen J., Jorgensen C., Bothe H., Jorgensen L. Heterotrophic bacteria growing in association with *Methylococcus capsulatus* (Bath) in a single cell protein production process // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 59. P. 33–39.
- But S.Y., Egorova S.V., Khmelena V.N., Mustakhimov I.I. Malyl-CoA lyase provides glycine/glyoxylate synthesis in type I methanotrophs // FEMS Microbiol. Lett. 2020. V. 367. fnaa207.
- Chaumeil P.-A., Mussig A.J., Hugenholtz P., Parks D.H. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database // Bioinformatics. 2020. V. 36. P. 1925–1927.
- Chistoserdova L., Lidstrom M.E. Aerobic methylotrophic prokaryotes // The Prokaryotes: Prokaryotic Physiology and Biochemistry. 2013. P. 267–285.
- Chu F., Beck D.C., Lidstrom M.E. MxaY regulates the lanthanide-mediated methanol dehydrogenase switch in *Methylomicrobium buryatense* // PeerJ. 2016. V. 4. Art. e2435.
- Chu F., Lidstrom M.E. XoxF acts as the predominant methanol dehydrogenase in the type I methanotroph *Methylomicrobium buryatense* // J. Bacteriol. 2016. V. 198. P. 1317–1325.
- Conrad R. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved // Environ. Microbiol. Rep. 2009. V. 1. P. 285–292.
- Crombie A., Murrell J.C. Development of a system for genetic manipulation of the facultative methanotroph *Methylocella silvestris* BL2 // Methods Enzymol. 2011. V. 495. P. 119–133.
- Csaki R., Bodrossy L., Klem J., Murrell J.C., Kovacs K.L. Genes involved in the copper-dependent regulation of soluble methane monooxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath): cloning, sequencing and mutational analysis // Microbiology (SGM). 2003. V. 149. P. 1785–1795.
- Davamani V., Parameswari E., Arulmani S. Mitigation of methane gas emissions in flooded paddy soil through the utilization of methanotrophs // Sci. Total Environ. 2020. V. 726. Art. 138570.
- De la Torre A., Metivier A., Chu F., Laurens L.M., Beck D.A., Pienkos P.T., Lidsrom M.E., Kalyuzhnaya M.G. Genome-scale metabolic reconstructions and theoretical investigation of methane conversion in *Methylomicrobium buryatense* strain 5G(B1) // Microb. Cell Factories. 2015. V. 14. P. 188.
- Dedysh S.N., Dunfield P.F. Facultative methane oxidizers // Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology / Ed. Timmis K.N. Berlin: Springer-Verlag, 2010. P. 1967–1976.
- Dedysh S.N., Knief C. Diversity and phylogeny of described aerobic methanotrophs // Methane Biocatalysis: Paving the Way to Sustainability. 2018. P. 17–42.
- Dunfield P.F., Dedysh S.N. *Methylocella*: a gourmand among methanotrophs // Trends Microbiol. 2014. V. 22. P. 368–369.
- Eccleston M., Kelly D.P. Assimilation and toxicity of some exogenous C1 compounds, alcohols, sugars and acetate in the methane-oxidizing bacterium *Methylococcus capsulatus* // J. Gen. Microbiol. 1973. V. 75. P. 211–221.
- Espah Borujeni A., Channarasappa A.S., Salis H.M. Translation rate is controlled by coupled trade-offs between site accessibility, selective RNA unfolding and sliding at up-

- stream standby sites // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. P. 2646–2659.
- Fu Y., He L., Reeve J., Beck D.A.C., Lidstrom M.E. Core metabolism shifts during growth on methanol versus methane in the methanotroph *Methylobacterium buryatense* 5GB1 // *MBio.* 2019. V. 10. P. e00406–19.
- Fu Y., Li Y., Lidstrom M. The oxidative TCA cycle operates during methanotrophic growth of the Type I methanotroph *Methylobacterium buryatense* 5GB1 // *Metab. Eng.* 2017. V. 42. P. 43–51.
- Garg S., Wu H., Clomburg J.M., Bennett G.N. Bioconversion of methane to C-4 carboxylic acids using carbon flux through acetyl-CoA in engineered *Methylobacterium buryatense* 5GB1C // *Metab. Eng.* 2018. P. 48. P. 175–183.
- Garneau J.E., Dupuis M.-È., Villion M., Romero D.A., Barrangou R., Boyaval P., Fremaux C., Horvath P., Magadán A.H., Moineau S. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA // *Nature* 2010. V. 468. P. 67–71.
- Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. P. E2579–E2586.
- Haque M.F.U., Gu W., DiSpirito A.A., Semrau J.D. Marker exchange mutagenesis of *mxhF*, encoding the large subunit of the Mxa methanol dehydrogenase, in *Methylobacterium trichosporium* OB3b // *Appl. Environ. Microbiol.* 2016. V. 82. P. 1549–1555.
- Hamer G., Harrison D.E.F. Single cell protein: the technology, economics and future potential // *Hydrocarbons in Biotechnology* / Eds. Harrison D.E.F., Higgins I.J., London W.R. London: Heyden Institute of Petroleum, 1980. P. 59–73.
- Hanson R.S., Hanson T.E. Methanotrophic bacteria // *Microbiol. Rev.* 1996. V. 60. P. 439–471.
- Harwood J.H., Williams E., Bainbridge B.W. Mutation of the methane oxidizing bacterium *Methylobacterium capsulatus* // *J. Appl. Bacteriol.* 1972. V. 35. P. 99–108.
- Henard C.A., Franklin T.G., Youhenna B., But S., Alexander D., Kalyuzhnaya M.G., Guarneri M.T. Biogas biocatalysis: methanotrophic bacterial cultivation, metabolite profiling, and bioconversion to lactic acid // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. Art. 2610.
- Henard C.A., Smith H., Dowe N., Kalyuzhnaya M.G., Pienkos P.T., Guarneri M.T. Bioconversion of methane to lactate by an obligate methanotrophic bacterium // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. Art. 21585.
- Henard C.A., Wu C., Xiong W., Henard J.M., Davidheiser-Kroll B., Orata F.D., Guarneri M.T. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) is essential for growth of the methanotroph *Methylobacterium capsulatus* strain Bath // *Appl. Environ. Microbiol.* 2021. V. 87. P. e00881–21.
- Henard C.A., Bourret T.J., Song M., Vázquez-Torres A. Control of redox balance by the stringent response regulatory protein promotes antioxidant defenses of *Salmonella* // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 36785–36793.
- Henard C.A., Akberdin I.R., Kalyuzhnaya M.G., Guarneri M.T. Muonic acid production from methane using rationally-engineered methanotrophic biocatalysts // *Green Chem.* 2019. V. 21. P. 6731–6737.
- Hu L., Guo S., Yan X., Zhang T., Xiang J., Fei Q. Exploration of an efficient electroporation system for heterologous gene expression in the genome of methanotroph // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. Art. 717033.
- Ishikawa M., Yokoe S., Kato S., Hori K. Efficient counterselection for *Methylobacterium capsulatus* (Bath) by using a mutated *pheS* gene // *Appl. Environ. Microbiol.* 2018. V. 84. P. e01875–18.
- Jiang D., Kim C.S., Hanson R.S., Wood T.K. Optimization of trichloroethylene degradation using soluble methane monooxygenase of *Methylobacterium trichosporium* OB3b expressed in recombinant bacteria // *Biotechnol. Bioeng.* 1996. V. 51. P. 349–359.
- Jiang H., Chen Y., Jiang P., Zhang C., Smith T.J., Murrell J.C., Xing X.H. Methanotrophs: multifunctional bacteria with promising applications in environmental bioengineering // *Biochem. Eng. J.* 2010. V. 49. P. 277–288.
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity // *Science* 2012. V. 337. P. 816–821.
- Kalyuzhnaya M.G., Kumaresan D., Heimann K., Caetano N.S., Visvanathan C., Parthiba Karthikeyan O. Editorial: Methane: a bioresource for fuel and biomolecules // *Front. Environ. Sci.* 2020. V. 8. Art. 9.
- Kalyuzhnaya M.G., Puri A.W., Lidstrom M.E. Metabolic engineering in methanotrophic bacteria // *Metab. Engin.* 2015. V. 29. P. 142–152.
- Kalyuzhnaya M.G., Yang S., Rozova O.N., Smalley N.E., Clubb J., Lamb A., Gowda G.N., Raftery D., Fu Y., Bringel F. Highly efficient methane biocatalysis revealed in a methanotrophic bacterium // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. P. 2785.
- Khadem A.F., Pol A., Wieczorek A., Mohammadi S.S., Francoijs K.J., Stunnenberg H.G., Jetten M.S.M., Op den Camp H.J.M. Autotrophic methanotrophy in verrucomicrobia: *Methylobacterium fumarolicum* SolV uses the Calvin–Benson–Bassham cycle for carbon dioxide fixation // *J. Bacteriol.* 2011. V. 193. P. 4438–4446.
- Khider M.L.K., Brautaset T., Irla M. Methane monooxygenases: central enzymes in methanotrophy with promising biotechnological applications // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2021. V. 37. P. 72.
- Khmelenina V.N., But S.Y., Rozova O.N., Trotsenko Y.A. Metabolic features of aerobic methanotrophs: news and views // *Curr. Issues Mol. Biol.* 2019. V. 33. P. 85–100.
- Khmelenina V.N., Kalyuzhnaya M.G., Sakharovsky V.G., Suzina N.E., Trotsenko Y.A., Gottschalk G. Osmoadaptation in halophilic and alkaliphilic methanotrophs // *Arch. Microbiol.* 1999. V. 172. P. 321–329.
- Knief C. Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic bacteria evaluated based on *pmoA* as molecular marker // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. P. 1346.
- Le H.T.Q., Nguyen A.D., Park Y.R., Lee E.Y. Sustainable biosynthesis of chemicals from methane and glycerol via reconstruction of multi-carbon utilizing pathway in obligate methanotrophic bacteria // *Microb. Biotechnol.* 2021. V. 14. P. 2552–2565.
- Lee H.M., Ren J., Tran K.M., Jeon B.M., Park W.U., Kim H., Lee K.E., Oh Y., Choi M., Kim D.S., Na D. Identification of efficient prokaryotic cell-penetrating peptides with applications in bacterial biotechnology // *Commun. Biol.* 2021a. V. 4. P. 205.
- Lee H.M., Ren J., Yu M.S., Kim H., Kim W.Y., Shen J., Yoo S.M., Eyun S.I., Na D. Construction of a tunable pro-

- moter library to optimize gene expression in *Methylomonas* sp. DH-1, a methanotroph, and its application to cadaverine production // *Biotechnol. Biofuels*. 2021b. V. 14. P. 228.
- Lee J.K., Kim S., Kim W., Kim S., Cha S., Moon H., Hur D.H., Kim S.Y., Na J.G., Lee J.W., Lee E.Y., Hahn J.S. Efficient production of d-lactate from methane in a lactate-tolerant strain of *Methylomonas* sp. DH-1 generated by adaptive laboratory evolution // *Biotechnol. Biofuels*. 2019. V. 12. P. 234.
- Lieven C., Petersen L.A.H., Jørgensen S.B., Gernaey K.V., Herrgard M.J., Sonnenschein N. A genome-scale metabolic model for *Methylococcus capsulatus* (Bath) suggests reduced efficiency electron transfer to the particulate methane monooxygenase // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. Art. 2947.
- Liu Y., He X., Zhu P., Cheng M., Hong Q., Yan X. phe^{SAG} based rapid and efficient markerless mutagenesis in *Methylovinumicrobium* // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. Art. 441.
- Liu Y., Zhang H., He X., Liu J. Genetically engineered methanotroph as a platform for bioaugmentation of chemical pesticide contaminated soil // *ACS Synth. Biol.* 2021. V. 10. P. 487–494.
- Lloyd J.S., Finch R., Dalton H., Murrell J.C. Homologous expression of soluble methane monooxygenase genes in *Methylosinus trichosporium* OB3b // *Microbiology (SGM. Reading)*. 1999. V. 145. P. 461–470.
- Marx C.J., Lidstrom M.E. Broad-host-range cre-lox system for antibiotic marker recycling in gram-negative bacteria // *Biotechniques*. 2002. V. 33. P. 1062–1067.
- Marx C.J., Lidstrom M.E. Development of improved versatile broad-host-range vectors for use in methylotrophs and other Gram-negative bacteria // *Microbiology*. 2001. V. 147. P. 2065–2075.
- Marx C.J. Development of a broad-host-range sacB-based vector for unmarked allelic exchange // *BMC Res. Notes*. 2008. V. 1. Art. 1.
<https://doi.org/10.1186/1756-0500-1-1>
- Murrell J.C., Gilbert B., McDonald I.R. Molecular biology and regulation of methane monooxygenase // *Arch. Microbiol.* 2000. V. 173. P. 325–332.
- Murrell J.C., Smith T.J. Biochemistry and Molecular Biology of Methane Monooxygenase. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Berlin–Heidelberg: Springer, 2010. P. 1045–1055.
- Mustakhimov I.I., Reshetnikov A.S., Glukhov A.S., Khmeleina V.N., Kalyuzhnaya M.G., Trotsenko Y.A. Identification and characterization of EctR1, a new transcriptional regulator of the ectoine biosynthesis genes in the halotolerant methanotroph *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z // *J. Bacteriol.* 2010. V. 192. P. 410–417.
- Naizabekov S., Lee E.Y. Genome-scale metabolic model reconstruction and *in silico* investigations of methane metabolism in *Methylosinus trichosporium* OB3b // *Microorganisms*. 2020. V. 8. P. 437.
- Nguyen A.D., Chau T.H.T., Lee E.Y. Methanotrophic microbial cell factory platform for simultaneous conversion of methane and xylose to value-added chemicals // *Chem. Eng. J.* 2021. V. 420. P. 127632.
- Nguyen A.D., Hwang I.Y., Lee O.K., Kim D., Kalyuzhnaya M.G., Mariyana R., Hadiyati S., Kim M.S., Lee E.Y. Systematic metabolic engineering of *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z for 2,3-butanediol production from methane // *Metab. Engin.* 2018. V. 47. P. 323–333.
- Nguyen D., Lee O.K., Lim C., Lee J., Na J.-G., Lee E.Y. Metabolic engineering of type II methanotroph, *Methylosinus trichosporium* OB3b, for production of 3-hydroxypropionic acid from methane via a malonyl-CoA reductase-dependent pathway // *Metab. Engin.* 2020a. V. 59. P. 142–150.
- Nguyen D.T.N., Lee O.K., Hadiyati S., Affifah A.N., Kim M.S., Lee E.Y. Metabolic engineering of the type I methanotroph *Methylomonas* sp. DH-1 for production of succinate from methane // *Metab. Engin.* 2019. V. 54. P. 170–179.
- Nguyen L.T., Lee E.Y. Biological conversion of methane to putrescine using genome-scale model-guided metabolic engineering of a methanotrophic bacterium *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z // *Biotechnol. Biofuels*. 2019. V. 12. P. 147.
- Nguyen A.D., Kim D., Lee E.Y. Unlocking the biosynthesis of sesquiterpenoids from methane via the methylerythritol phosphate pathway in methanotrophic bacteria, using α -humulene as a model compound // *Metab. Engin.* 2020b. V. 61. P. 69–78.
- Op den Camp H.J.M., Islam T., Stott M.B., Harhangi H.R., Hynes A., Schouten S., Jetten M.S.M., Birkeland N.K., Pol A., Dunfield P.F. Environmental, genomic and taxonomic perspectives on methanotrophic *Verrucomicrobia* // *Environ. Microbiol. Rep.* 2009. V. 1. P. 293–306.
- Øverland M., Tauson A.H., Shearer K., Skrede A. Evaluation of methane-utilising bacteria products as feed ingredients for monogastric animals // *Arch. Anim. Nutr.* 2010. V. 64. P. 171–189.
- Parks D.H., Chuvochina M., Rinke C., Mussig A.J., Chauveil P.-A., Hugenholtz P. GTDB: an ongoing census of bacterial and archaeal diversity through a phylogenetically consistent, rank normalized and complete genome-based taxonomy // *Nucleic Acids Res.* 2022. V. 50. P. D785–D794.
- Pham D.N., Nguyen A.D., Lee E.Y. Outlook on engineering methylotrophs for one-carbon-based industrial biotechnology // *Chem. Engin. J.* 2022a. V. 449. P. 137769.
- Pham D.N., Nguyen A.D., Oh S.H., Lee E.Y. Bypassing the bottlenecks in the shikimate and methylerythritol phosphate pathways for enhancing the production of natural products from methane in *Methylovinumicrobium alcaliphilum* 20Z // *Green Chem.* 2022b. V. 24. P. 2893–2903.
- Pham D.N., Mai D.H.A., Nguyen A.D., Chau T.H.T., Lee E.Y. Development of an engineered methanotroph-based microbial platform for biocatalytic conversion of methane to phytohormone for sustainable agriculture // *Chem. Engin. J.* 2022c. V. 429. Art. 132522.
- Pieja A.J., Morse M.C., Cal A.J. Methane to bioproducts: the future of the bioeconomy? // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2017. V. 41. P. 123–131.
- Puri A.W., Owen S., Chu F., Chavkin T., Beck D.A.C., Kalyuzhnaya M.G. Genetic tools for the industrially promising methanotroph *Methylomicrobium buryatense* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2015. V. 81. P. 1775–1781.
- Recorbet G., Robert C., Givaudan A., Kudla B., Normand P., Faurie G. Conditional suicide system of *Escherichia coli* released into soil that uses the *Bacillus subtilis* sacB gene // *Appl. Environ. Microbiol.* 1993. V. 59. P. 1356–1365.
- Ren J., Lee H.-M., Thai T.D., Na D. Identification of a cytosine methyltransferase that improves transformation efficiency in *Methylomonas* sp. DH-1 // *Biotechnol. Biofuels*. 2020. V. 13. P. 200.

- Ro S.Y., Rosenzweig A.C. Recent advances in the genetic manipulation of *Methylosinus trichosporium* OB3b // *Methods Enzymol.* 2018. V. 605. P. 335–349.
- Salis H.M., Mirsky E.A., Voigt C.A. Automated design of synthetic ribosome binding sites to control protein expression // *Nat. Biotechnol.* 2009. V. 27. P. 946–950.
- Schmitz R.A., Peeters S.H., Versantvoort W., Picone N., Pol A., Jetten M.S.M., Op Den Camp H.J.M. Verrucomicrobial methanotrophs: ecophysiology of metabolically versatile acidophiles // *FEMS Microbiol. Rev.* 2021. V. 45. fuab007.
- Shaner N.C., Campbell R.E., Steinbach P.A., Giepmans B.N.G., Palmer A.E., Tsien R.Y. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. P. 1567–1572.
- Stafford G.P., Scanlan J., McDonald I.R., Murrell J.C. *rpoN*, *mmoR* and *mmoG*, genes involved in regulating the expression of soluble methane monooxygenase in *Methylosinus trichosporium* OB3b // *Microbiology (SGM)*. 2003. V. 149. P. 1771–1784.
- Sternberg N., Hamilton D. Bacteriophage P1 site-specific recombination: I. Recombination between loxP sites // *J. Mol. Biol.* 1981. V. 150. P. 467–486.
- Strong P.J., Xie S., Clarke W.P. Methane as a resource: can the methanotrophs add value? // *Environ. Sci. Technol.* 2015. V. 49. P. 4001–4018.
- Tapscott T., Guarnieri M.T., Henard C.A. Development of a CRISPR/Cas9 system for *Methylococcus capsulatus* in vivo gene editing // *Appl. Environ. Microbiol.* 2019. V. 85. e00340-19.
- Trotsenko Y.A., Murrell J.C. Metabolic aspects of aerobic obligate methanotrophy // *Adv. Appl. Microbiol.* 2008. V. 63. P. 183–229.
- Welander P.V., Summons R.E. Discovery, taxonomic distribution, and phenotypic characterization of a gene required for 3-methylhopanoid production // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. P. 12905–12910.
- Williams E., Shimmin M.S., Bainbridge B.W. Mutation in the obligate methylotrophs *Methylococcus capsulatus* and *Methylomonas albus* // *FEMS Microbiol. Lett.* 1977. V. 2. P. 293–296.
- Wilson E.H., Groom J.D., Sarfatis M.C., Ford S.M., Lidstrom M.E., Beck D.A. A computational framework for identifying promoter sequences in nonmodel organisms using RNA-seq data sets // *ACS Synth. Biol.* 2021. V. 10. P. 1394–1405.
- Yan X., Chu F., Puri A.W., Fu Y., Lidstrom M.E. Electroporation-based genetic manipulation in type I methanotrophs // *Appl. Environ. Microbiol.* 2016. V. 82. P. 2062–2069.
- Ye R.W., Yao H., Stead K., Wang T., Tao L., Cheng Q., Sharpe P.L., Suh W., Nagel E., Arcilla D., Dragotta D., Miller E.S. Construction of the astaxanthin biosynthetic pathway in a methanotrophic bacterium *Methylomonas* sp. strain 16a // *Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2007. V. 34. P. 289–299.
- Zheng Y., Huang J., Zhao F., Chistoserdova L. Physiological effect of XoxG(4) on lanthanide-dependent methanotrophy // *mBio.* 2018. V. 9. e02430-17.

Genome Editing in Methanotrophic Bacteria: Potential Targets and Available Tools

V. N. Khmelenina¹, S. Yu. But^{1,2}, O. N. Rozova^{1,2}, I. Yu. Oshkin², N. V. Pimenov², and S. N. Dedysh^{2,*}

¹*Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, Moscow region, Pushchino, 142290 Russia*

²*Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

*e-mail: dedysh@mail.ru

Received July 17, 2022; revised July 26, 2022; accepted July 26, 2022

Abstract—Aerobic methanotrophic bacteria are prokaryotic microorganisms possessing methane monooxygenases, unique enzymes that determine their ability to utilize methane (CH₄) as a growth substrate. This metabolic capability makes methanotrophs attractive objects for biotechnological applications aimed at utilizing methane for production of microbial cell protein and various target metabolites. The current raise of interest to these biotechnologies is driven by high availability of methane, which is a major component of natural gas, as well as of the biogas produced in anaerobic fermentation processes. Since aerobic methanotrophs oxidize methane at the ambient temperature and pressure, they represent natural cell factories for converting CH₄ into various value-added products. Further development of biotechnologies based on methane utilization requires application of genome editing techniques to obtain producer strains with improved characteristics. For a long time, the progress in metabolic engineering of methanotrophs was hampered by their specific metabolic properties and the difficulties of handling these bacteria. Here, we present an overview of the latest achievements in the field of metabolic engineering of methanotrophic bacteria and identify the potential targets as well as the currently available tools for genome editing of these microorganisms. These techniques open up the possibility of constructing strains with biotechnologically relevant characteristics and conducting in-depth research of the metabolic features of aerobic methanotrophs.

Keywords: methanotrophic bacteria, methanotroph diversity, metabolic peculiarities of methanotrophs, bio-conversion of methane, genome editing, metabolic engineering