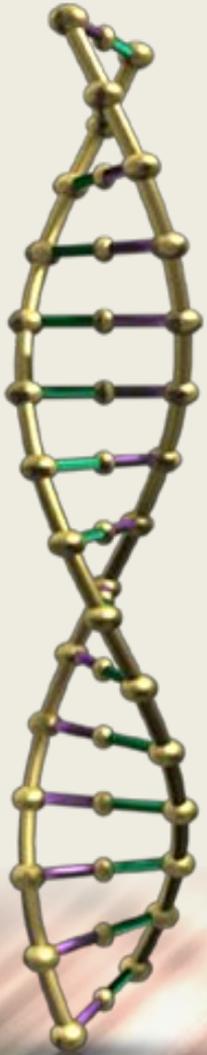
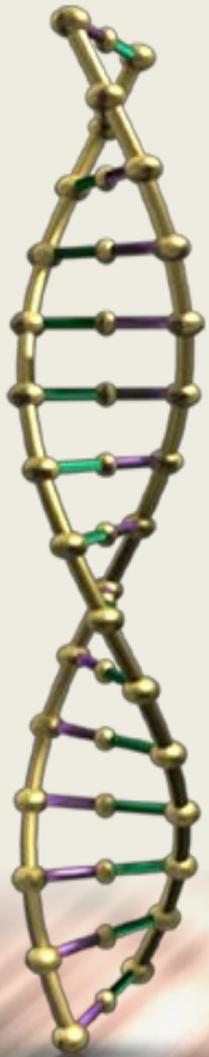


Лекция № 2

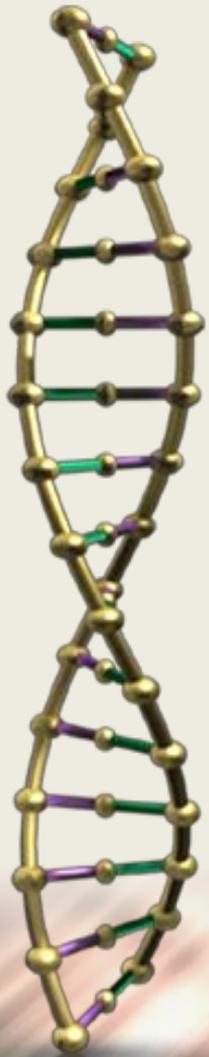
Объекты биотехнологии



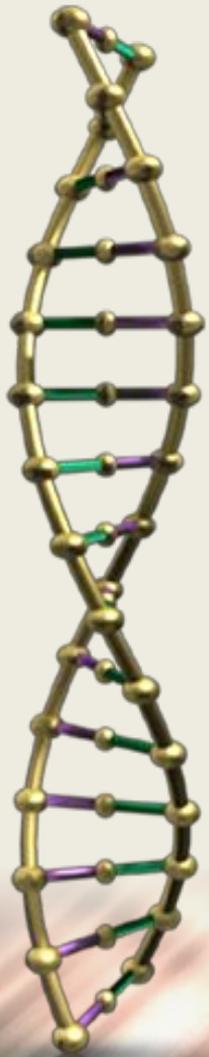
- **Биологический объект** ,
способный осуществлять
определенную модификацию
исходного сырья, и образовывать
необходимый продукт – **главное
звено** биотехнологического
процесса



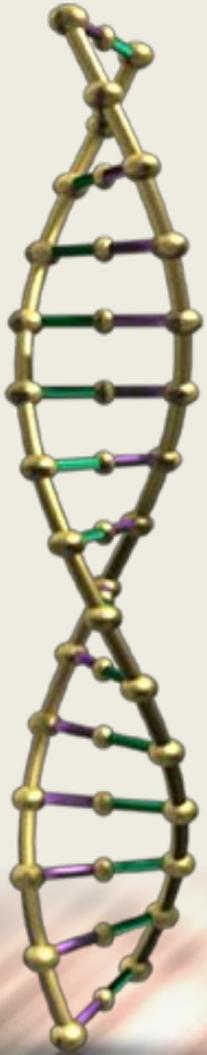
- **Объекты биотехнологии** - это клетки микроорганизмов, животных и растений, трансгенные животные и растения, а также многокомпонентные ферментные системы клеток и отдельные ферменты.



- В основе биотехнологических процессов – **микробный синтез** (синтез разнообразных биологически активных веществ с помощью микроорганизмов).
- Объекты растительного и животного происхождения не нашли столь широкого применения.



- Первичный этап разработки биотехнологического процесса – **получение чистых культур организмов** (в случае микроорганизмов) , **клеток или тканей** (растения и животные).
- Культуры микробных клеток и культуры тканей растений и животных не отличаются друг от друга с методической точки зрения.

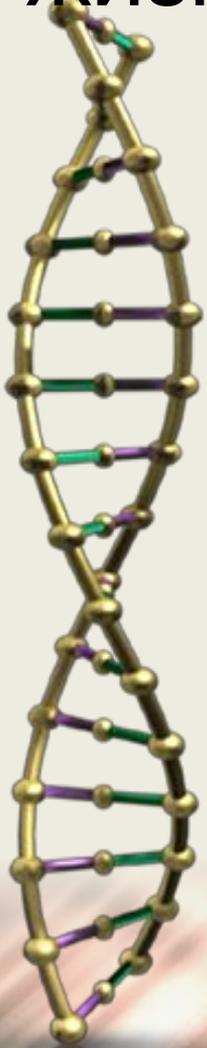


В настоящее время известно более
100 тыс. различных видов
микроорганизмов

- **Прокариоты** (бактерии, актиномицеты, риккетсии, цианобактерии)
- **Эукариоты** (дрожжи, нитчатые грибы, некоторые простейшие, водоросли).

Модельные объекты при исследовании фундаментальных жизненных процессов:

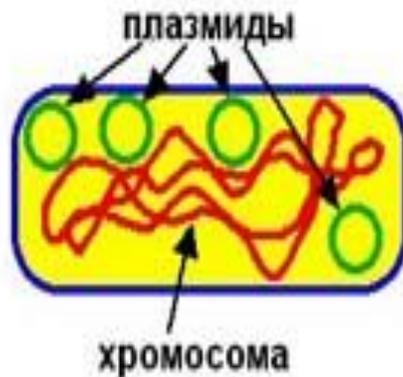
- Кишечная палочка (*E.coli*)
- Сенная палочка (*Bac. Subtilis*)
- Пекарские дрожжи (*S. Cerevisiae*)



Геном - совокупность всей наследственной информации организма

Генетическая информация бактерии *Escherichia coli*

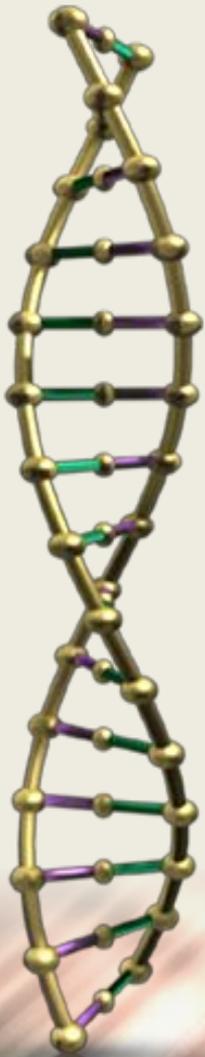
закодирована в единственной двуцепочечной кольцевой молекуле ДНК, содержащей 4.6 млн пар нуклеотидов



Мол. масса 3×10^6 Да

Длина молекулы ~ 1.5 мм

Время репликации - 20 мин.



GRAS (generally recognized as safe)

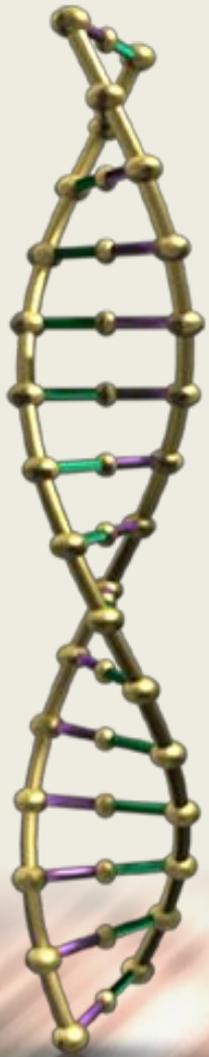


- *Bacillus subtilis*
- *Bacillus amyloliquefaciens*
- *Streptomyces*
- *Aspergillus*
- *Penicillium*
- *Mucor*
- *Rhizopus*
- *Sacchaomyces*

Классический подход в биотехнологии –
выделение нужного микроорганизма из
природных условий.

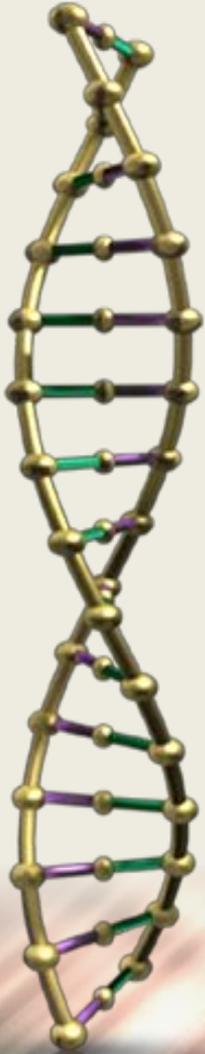
- Сначала получают **накопительные культуры**: из естественных мест обитания отбирают образцы материала и производят посев в селективную среду.
- Затем выделяют **чистую культуру** с дальнейшим изучением микроорганизма.





Главный критерий выбора биотехнологического объекта – способность синтезировать целевой продукт.

Требования к микроорганизмам-продуцентам



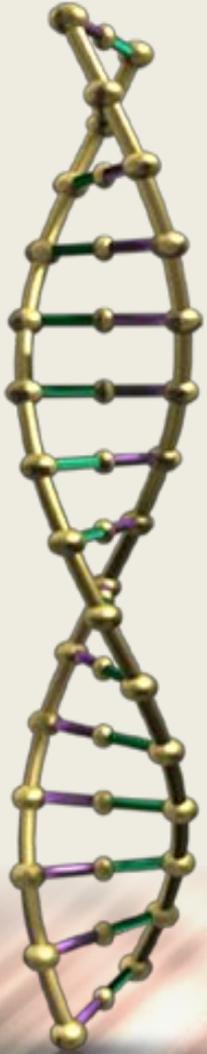
- Высокая скорость роста.
- Способность утилизировать необходимые для их жизнедеятельности дешевые субстраты.
- Резистентность к посторонней микрофлоре (высокая конкурентоспособность)

При подборе объектов в биотехнологии важным компонентом является их **селекция**.

На каждом этапе отбора нужного продуцента происходит сознательное конструирование геномов. Этот процесс не всегда возможно реализовать, так как иногда отсутствуют эффективные методы изменения геномов селектируемых организмов.



Ступенчатая селекция



На каждом этапе отбора из популяции микроорганизмов отбираются наиболее активные варианты (**спонтанные мутанты**). Из них на следующем этапе отбирают новые, более эффективные штаммы.

Метод индуцированного мутагенеза



Мутагенные воздействия:

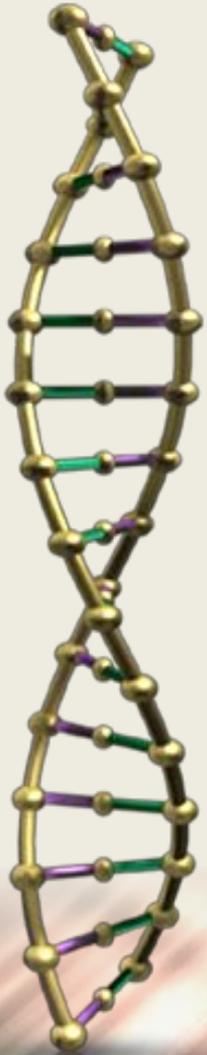
- УФ,
- рентгеновское излучение,
- гамма-излучение,
- химические вещества и т.д.

Недостатки индуцированного мутагенеза:



- Трудоемкость метода;
- Отсутствие сведений о характере изменений;

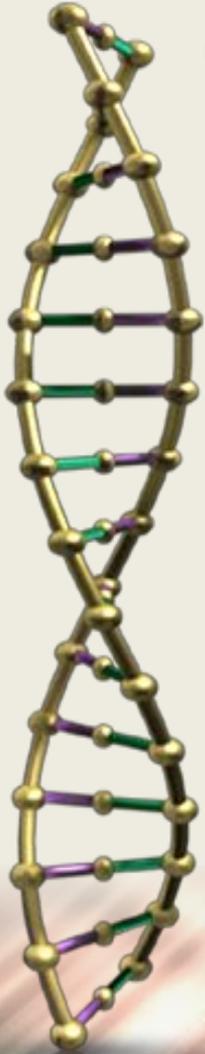
Современная тенденция – сознательное конструирование штаммов микроорганизмов с заданными свойствами на основе фундаментальных знаний о генетической организации и молекулярно-биологических механизмах осуществления основных функций организма.



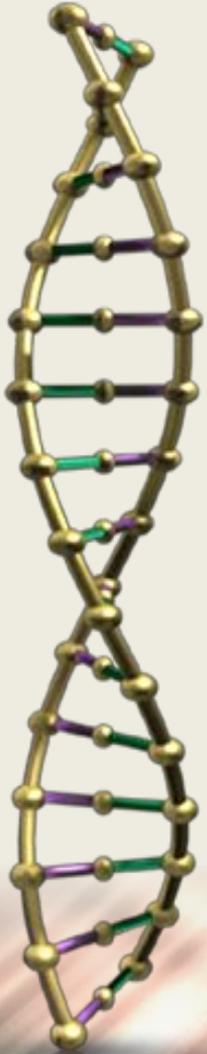
В селекции микроорганизмов для микробиологической промышленности важно **изменение регуляторных процессов в клетке (на основе принципа обратной связи)**

Пути изменения скорости биохимических реакций:

- Изменение каталитической активности индивидуальных молекул фермента (несколько секунд или минут).
- Изменение скорости синтеза ферментов (более длительный путь)



Существуют более простые механизмы регуляции активности метаболизма в клетке:

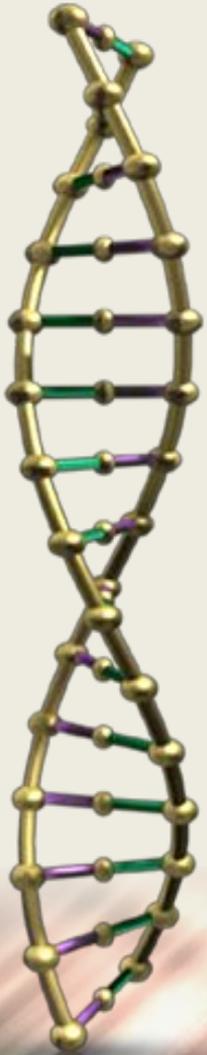


- Снижение концентрации субстрата при наличии фермента;
- Повышение концентрации субстрата при наличии фермента;
- Повышение концентрации ферментов;
- Увеличение концентрации в клетке какого-либо определенного предшественника.

Ретроингибирование

Это наиболее распространенный способ регуляции активности метаболических реакций в клетке.

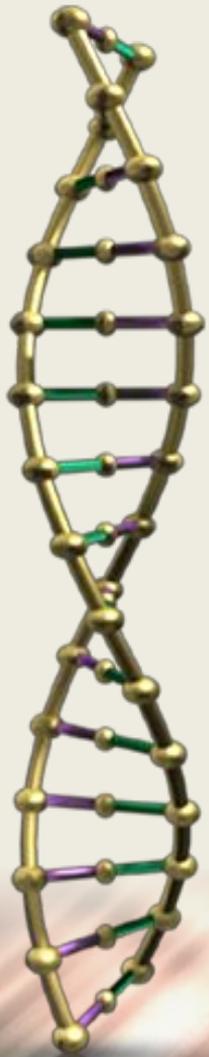
Биосинтез многих первичных метаболитов характеризуется тем, что при повышении концентрации конечного продукта данного биосинтетического пути угнетается активность одного из первых ферментов этого пути.



Ретроингибирование как процесс впервые наблюдался в 1953 году .

Исследование проводилось по биосинтезу триптофана клетками кишечной палочки *E.coli* (A.Novik и L. Szillard).





Авторами было обнаружено, что у одного из мутантов *E.coli* с нарушенным биосинтезом триптофана добавление данной аминокислоты резко тормозит накопление одного из предшественников – **индолглицерофосфата** в клетках.



Таким чувствительным к триптофану ферментом является **анранилатсинтетаза**, которая катализирует более раннюю реакцию триптофанового пути – образование **анранилата** из **хоризмата** и **глутамина**.

Было показано, что активность **анранилатсинтетазы** подавляется только триптофаном и никакие другие метаболиты клетки подобного действия не оказывают.

Ретроингибирование – общее свойство клеточного метаболизма.

Метаболит, являющийся ингибитором, специфически связывается с участком молекулы фермента, обладающим высокой степенью сродства к данному ингибитору и абсолютно отличающимся от активного центра фермента. Этот участок – **аллостерический центр**. А сами ферменты с таким центром – **аллостерические ферменты**.



Аллостерические ферменты -



Это олигомеры, состоящие из взаимодействующих между собой нескольких одинаковых или различающихся субъединиц.



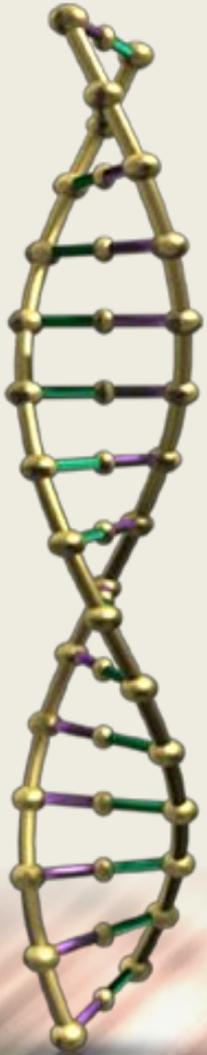
Зная точно механизм регуляции синтеза интересующего продукта, участвует ли в регуляции механизма **ретроингибирования**, можно пытаться получить более активный продуцент данного соединения. Для отбора таких продуцентов используют структурные аналоги метаболитов, по отношению к которым отбирают резистентные варианты.

Пример:

5-метилтриптофан , аналог триптофана, также как и триптофан , ингибирует активность анранилатсинтетазы, но не заменяет собой триптофан в клеточном метаболизме.

Вследствие этого данный структурный аналог необходимого метаболита задерживает рост бактерий, если он добавлен в среду.





В растущих клетках :

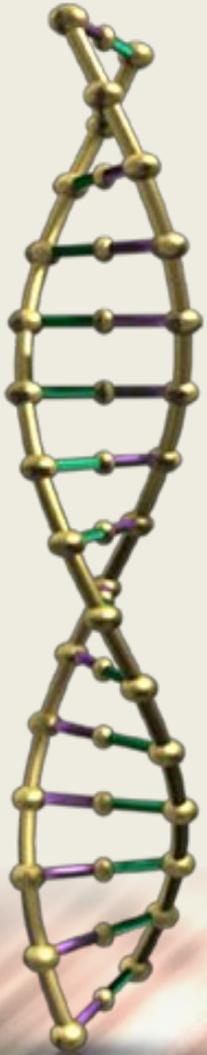
- ❑ Некоторые ферменты образуются постоянно, независимо от состава питательной среды (**конститутивные**);
- ❑ Остальные появляются лишь тогда, когда в среде присутствует субстрат их действия (**индуцибельные**).

Пример:

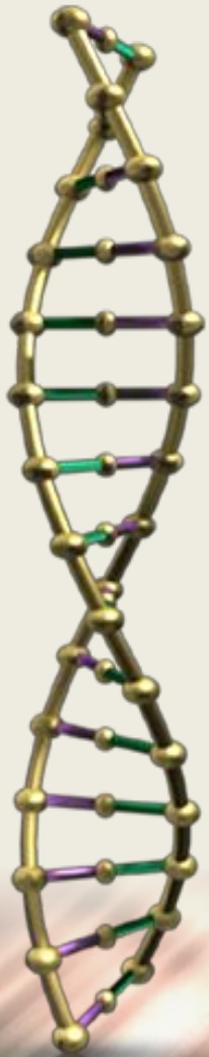
Клетки *E.coli*, растущие на среде с глюкозой, обладают следовыми количествами ферментов метаболизма лактозы, а также многих других источников углерода, которые способны усваивать клетки данного микроорганизма. Если эти же клетки перенести на среду с лактозой, то через 1-2 минуты можно зарегистрировать повышение активности **β -галактозидазы**.



Имеет место выраженная индукция фермента.



Индукция фермента – это относительное увеличение скорости его синтеза в ответ на появление в среде культивирования определенного химического соединения, называемого индуктором.



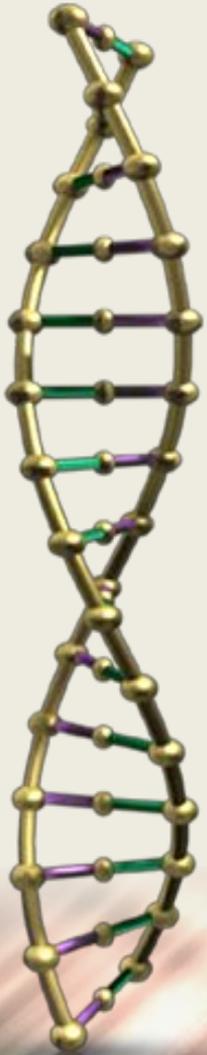
Достаточно часто великолепными индукторами являются не утилизируемые аналоги субстратов. Например, для β -галактозидазы таким веществом служит **изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (ИПТГ)** – неметаболизируемый аналог лактозы.

1961 год - *F.Jacob* и *J.Monod* – модель
оперона.

Данная модель регуляции состоит из
четырех компонентов:

1. Структурные гены (детерминируют структуру ферментов);
2. Ген-регулятор;
3. Оператор;
4. Промотор.

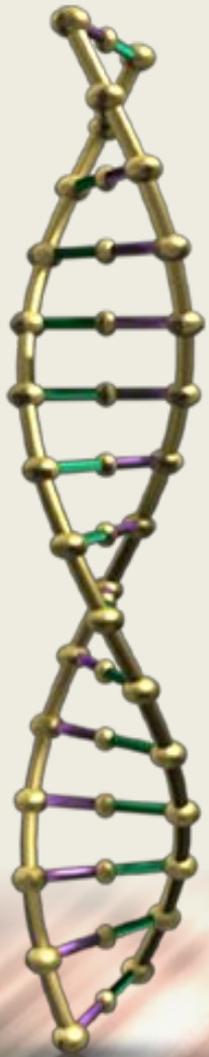




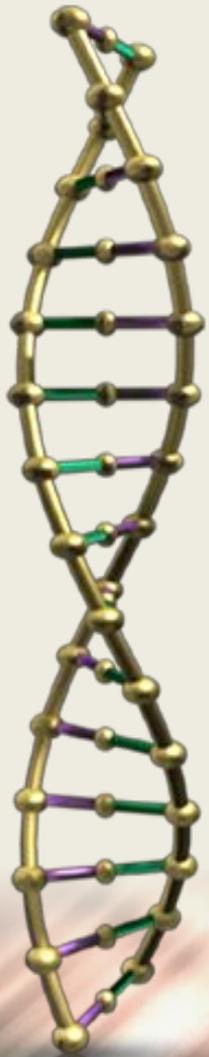
Ген-регулятор определяет структуру белка-репрессора, способного связываться с оператором.

Оператор контролирует функционирование прилежащих к нему структурных генов.

Промотор – область для связывания с ферментом транскрипции РНК – полимеразой.

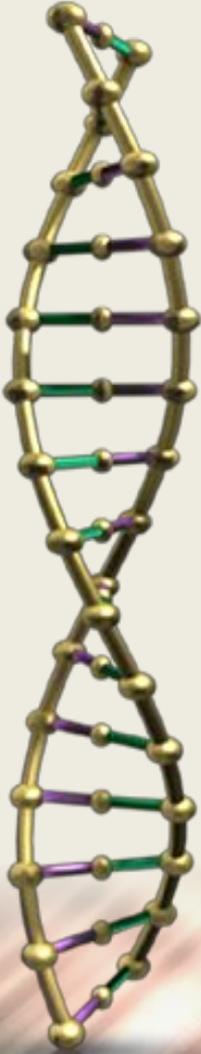


Если белок-репрессор связан с оператором, то РНК-полимераза не может перемещаться на промотор и синтез информационной РНК не может осуществляться. Результатом является отсутствие синтеза структурного гена.



Изменяя регуляцию индуцибельных и репрессибельных оперонов, существует возможность повышать продукционную активность определенных промышленных штаммов-продуцентов.

Структурные гена одного метаболического пути не всегда объединены в единый оперон (наподобие лактозному)



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!