

Микробные объекты в биотехнологии

История развития, предмет,
задачи, методы

к.х.н., доцент кафедры микробиологии
Герловский Денис Олегович

Целью настоящего курса является рассмотрение микроорганизмов как объектов биотехнологии, а также основных принципов и подходов, применяющихся для их эффективного использования в промышленном производстве.

В **задачи** дисциплины входит изучение структурно-функциональной организации объектов биотехнологии, продукции основных практически значимых метаболитов клеток микроорганизмов, а также принципов отбора биотехнологически значимых форм для использования их в промышленном производстве.

Предмет и объект исследования:

- структурно-функциональные особенности организации объектов биотехнологии;
- основные практически значимые метаболиты клеток микроорганизмов;
- принципы селекции продуцентов биологически активных соединений;
- принципы генной инженерии микроорганизмов;
- принципы клеточной инженерии микроорганизмов;
- основные направления использования микроорганизмов в промышленном производстве.

Термин «**биотехнология**» был введен в 1917 г. венгерским инженером К. Эреки при описании процесса крупномасштабного выращивания свиней с использованием в качестве корма дешевой сахарной свеклы. По определению Эреки, **биотехнология – это «все виды работ, при которых из сырьевых материалов с помощью живых организмов производятся те или иные продукты».**

Однако этот термин в те годы не получил широкого распространения. Только в 1961 г. к нему вновь вернулись после того, как шведский микробиолог К. Г. Хеден порекомендовал изменить название «Журнал микробиологической и химической инженерии и технологии» (журнал специализировался на публикации работ по прикладной микробиологии и промышленной ферментации) на «**Биотехнология и биоинженерия**». С этого момента биотехнология оказалась необратимо связана с исследованиями в области «**промышленного производства товаров и услуг при участии живых организмов, биологических систем и процессов**».

По определению академика **А.А. Баева (1984)**,
«биотехнология – это использование живых организмов и их систем в промышленных целях».

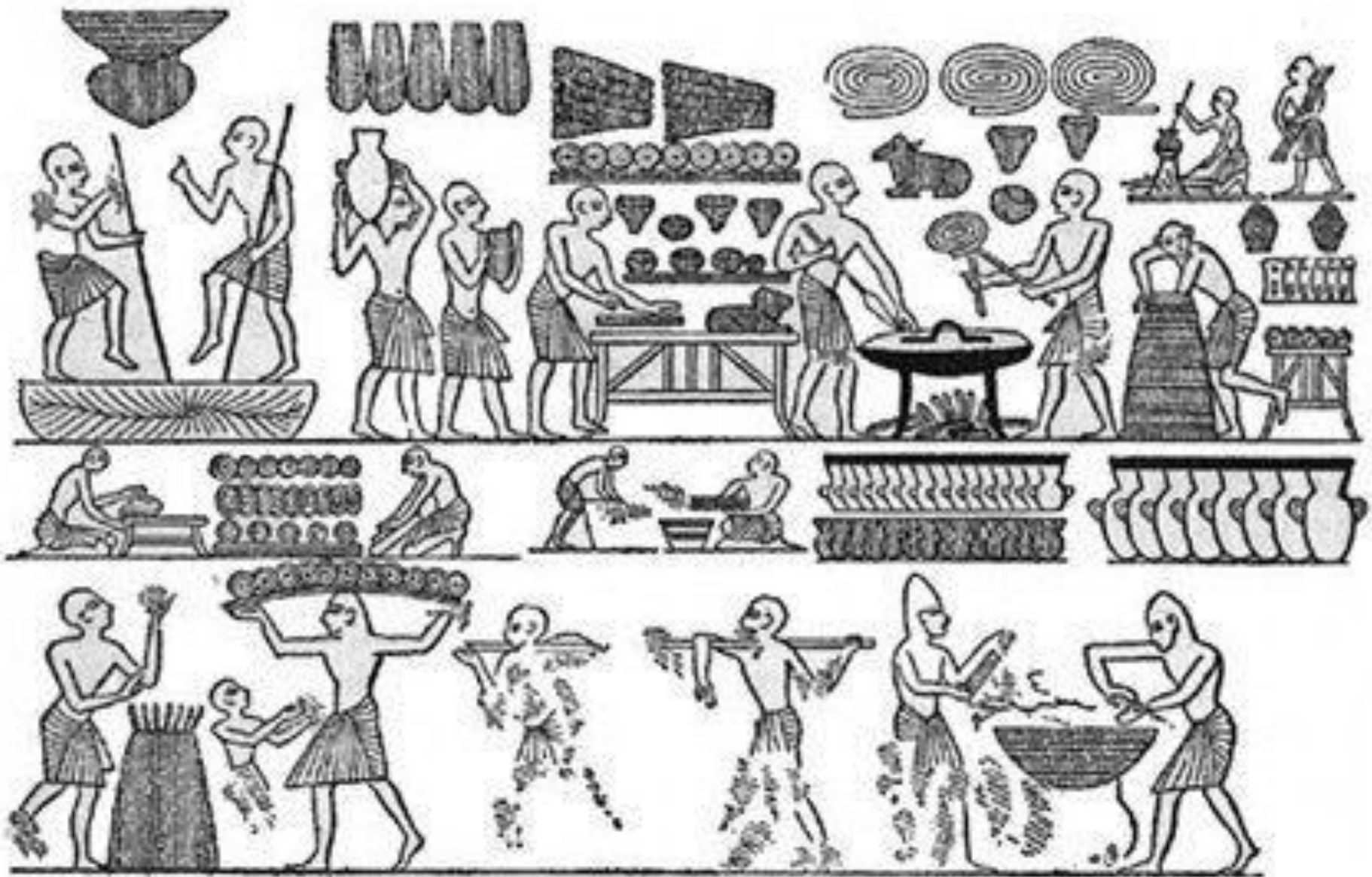
Голландский ученый **Е. Хаувинк (1984 г.)** предложил разделить историю развития биотехнологии на пять частично перекрывающихся периодов

1. Допастеровская эра (до 1865 г.).

Биотехнология возникла в древности (примерно 6000-5000 лет до н.э.), когда люди научились, используя процесс брожения, выпекать хлеб, варить пиво, готовить сыр, кисломолочные продукты, вино и уксус. При этом наши предки действовали интуитивно, ничего не зная о причинах брожения и о том, кем и как оно осуществляется. Однако опыт получения ферментированных продуктов передавался человеком из поколения в поколение на протяжении тысячелетий.

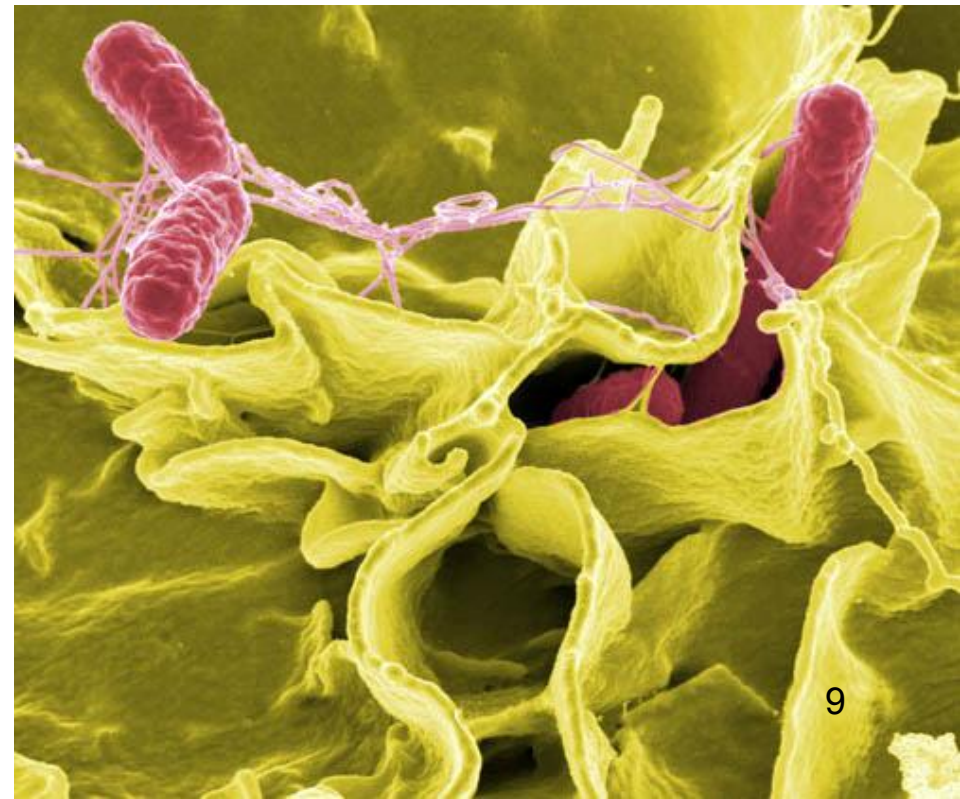
Первым микробиологическим процессом, использованным на практике, было **брожение**. С древнейших времен брожение применяли при хлебопечении, пивоварении и виноделии. Так, при раскопках Вавилона обнаружены дощечки, насчитывающие 6000 лет, с описанием процесса приготовления пива, а в пирамидах Египта, построенных в этот же период, – караван хлеба. Есть сведения об очистных сооружениях, которые функционировали в древнем Риме. С 3–4-го тысячелетий человеку известны процессы пектинового брожения, лежащие в основе мочки прядильных растений, льна, конопли и др.

С древнейших времен человечество сталкивалось и с отрицательными последствиями деятельности микроорганизмов (порча продуктов). Следствием этого на первых этапах были неосознанные, эмпирические попытки разработки методов и средств борьбы с этими явлениями. Так стали возникать методы консервирования продуктов.



В XVI–XVII веках сначала во Франции, а затем повсеместно для разрыхления теста стали использовать пивные дрожжи; позднее с изменением и совершенствованием технологии пивоварения для этих целей стали применять дрожжи спиртовых производств.

В Европе стали добывать медь в процессах бактериального выщелачивания.



Только в XIX веке французский ученый Луи Пастер установил, что микроорганизмы играют ключевую роль в процессах брожения, и показал, что в образовании отдельных продуктов участвуют разные их виды, которые отличаются не только морфологически, но и особенностями обмена веществ.



2. Послепастеровская эра (1866 – 1940 гг.).

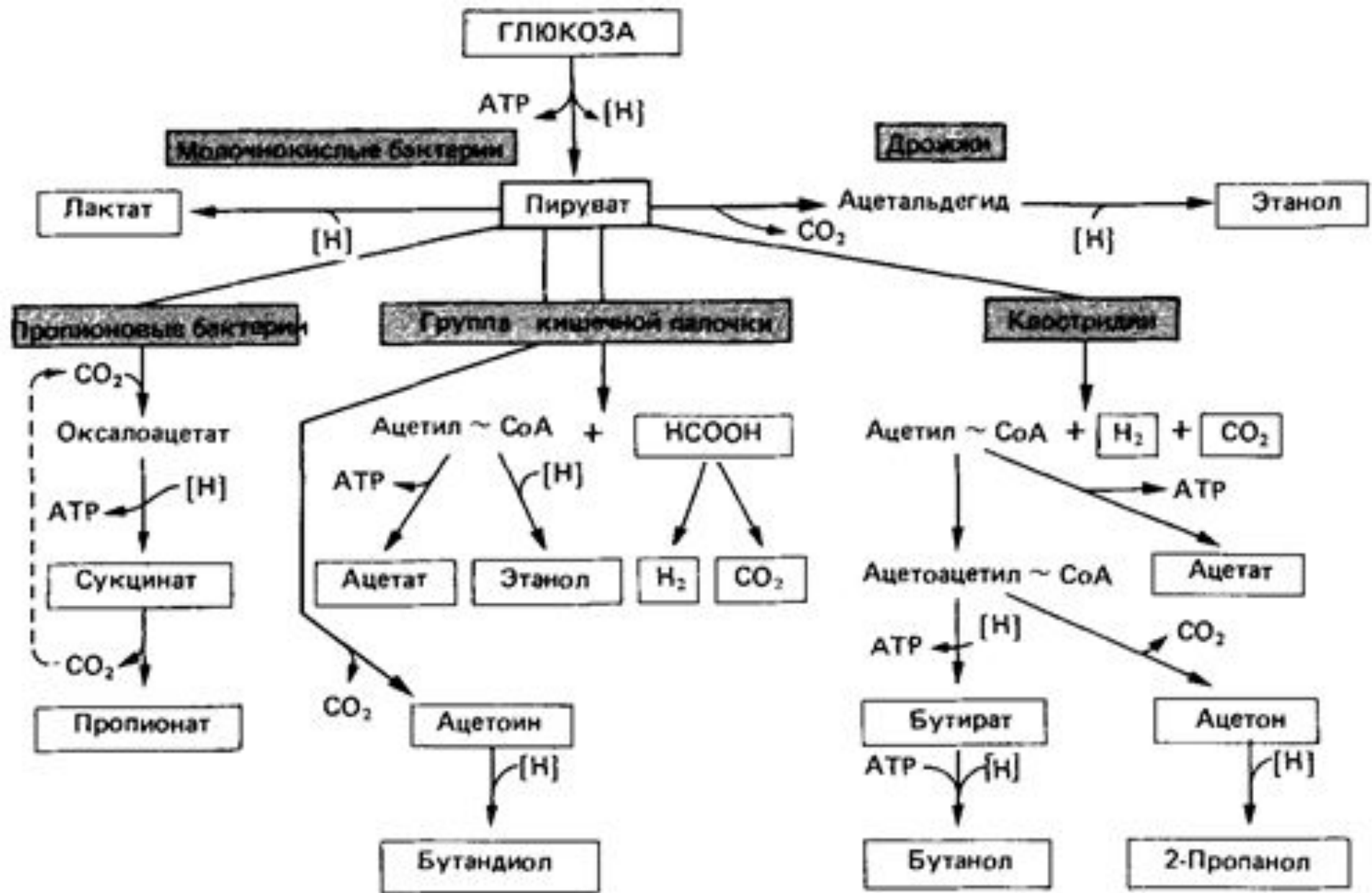
Исследования Л. Пастера послужили основой развития в конце XIX – начале XX вв. бродильного производства органических растворителей (этанола, бутанола, ацетона, и др.) и других химических веществ, при синтезе которых использовались разные виды микроорганизмов.

В этот период было освоено производство кормовых дрожжей с участием микроорганизмов, где в качестве субстрата использовали углеводороды.

Также была разработана аэробная очистка канализационных вод.

Были изучены теоретические основы специфики микробиологических процессов при выработке, хранении и созревании молочных продуктов.

Создано промышленное производство лимонной кислоты.

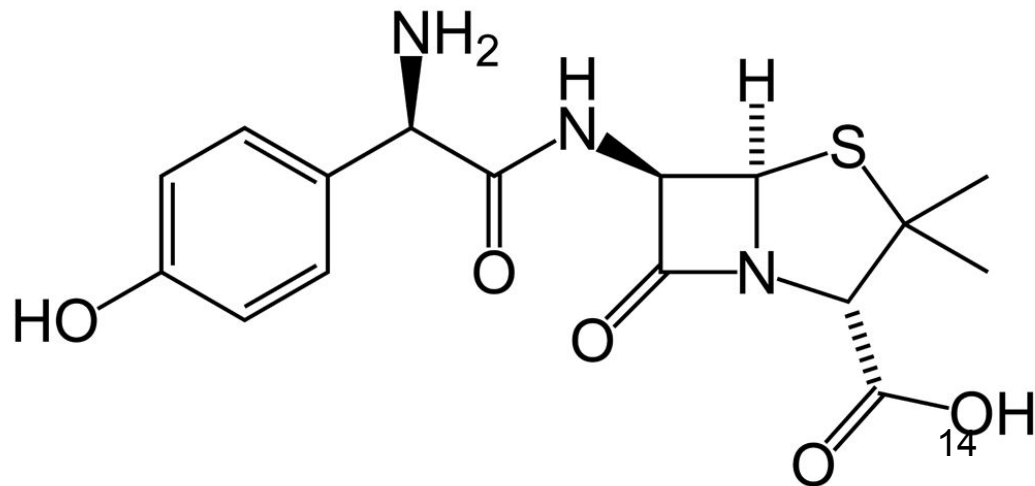
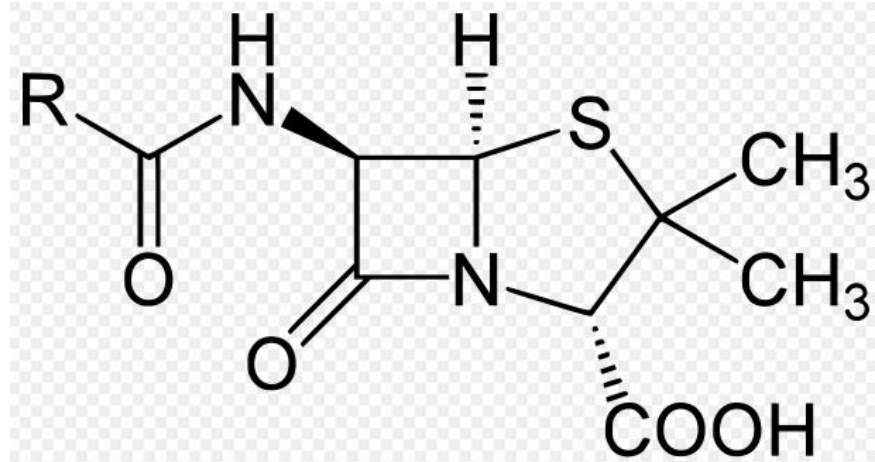
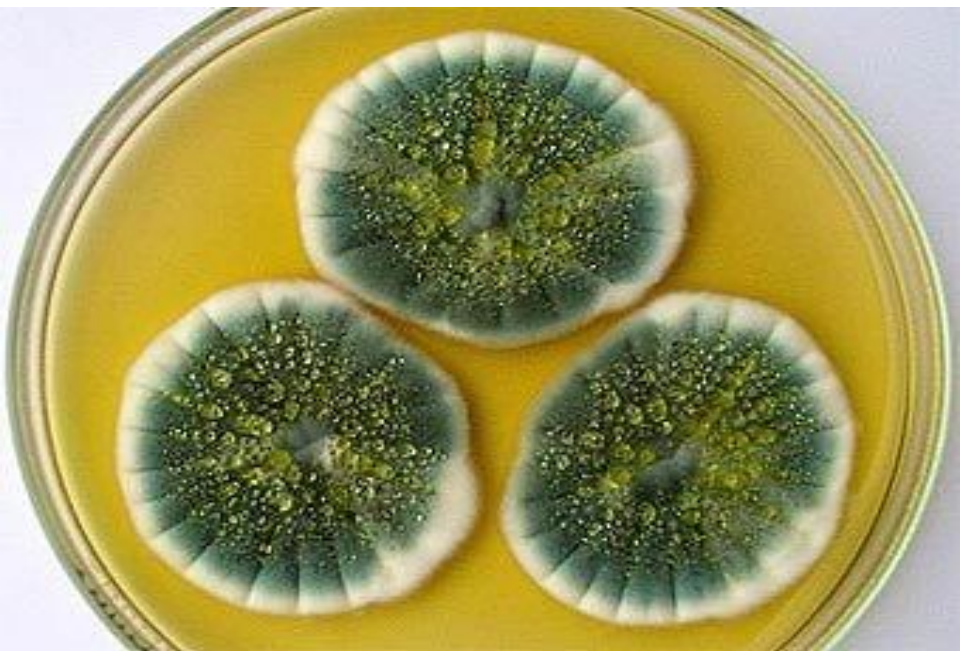


3. Эра антибиотиков (1941-1960 гг.).

Революционным моментом данного периода была промышленная реализация технологии производства антибиотиков. Отправной точкой при этом послужило открытие **Флемингом, Флори и Чейном** химиотерапевтического действия пенициллина. Практически одновременно в СССР **Ермольева**, изучая действие лизоцима, показала, что он является фактором естественного иммунитета, а **Гаузе и Бражникова** получили новый активный препарат – антибиотик грамицидин.

Началась интенсивная работа по поиску активных продуцентов антибиотиков, получению мутантов с измененными свойствами, обладающих способностью к их сверхсинтезу, а также разработка методов культивирования грибов, создания технологических схем крупномасштабного производства пенициллина, стрептомицина, хлортетрациклина и др. Микробное превращение стероидов (получение кортизона, тестостерона, эстрогена).

Это период становления генетики бактерий, а впоследствии – развития генной инженерии.

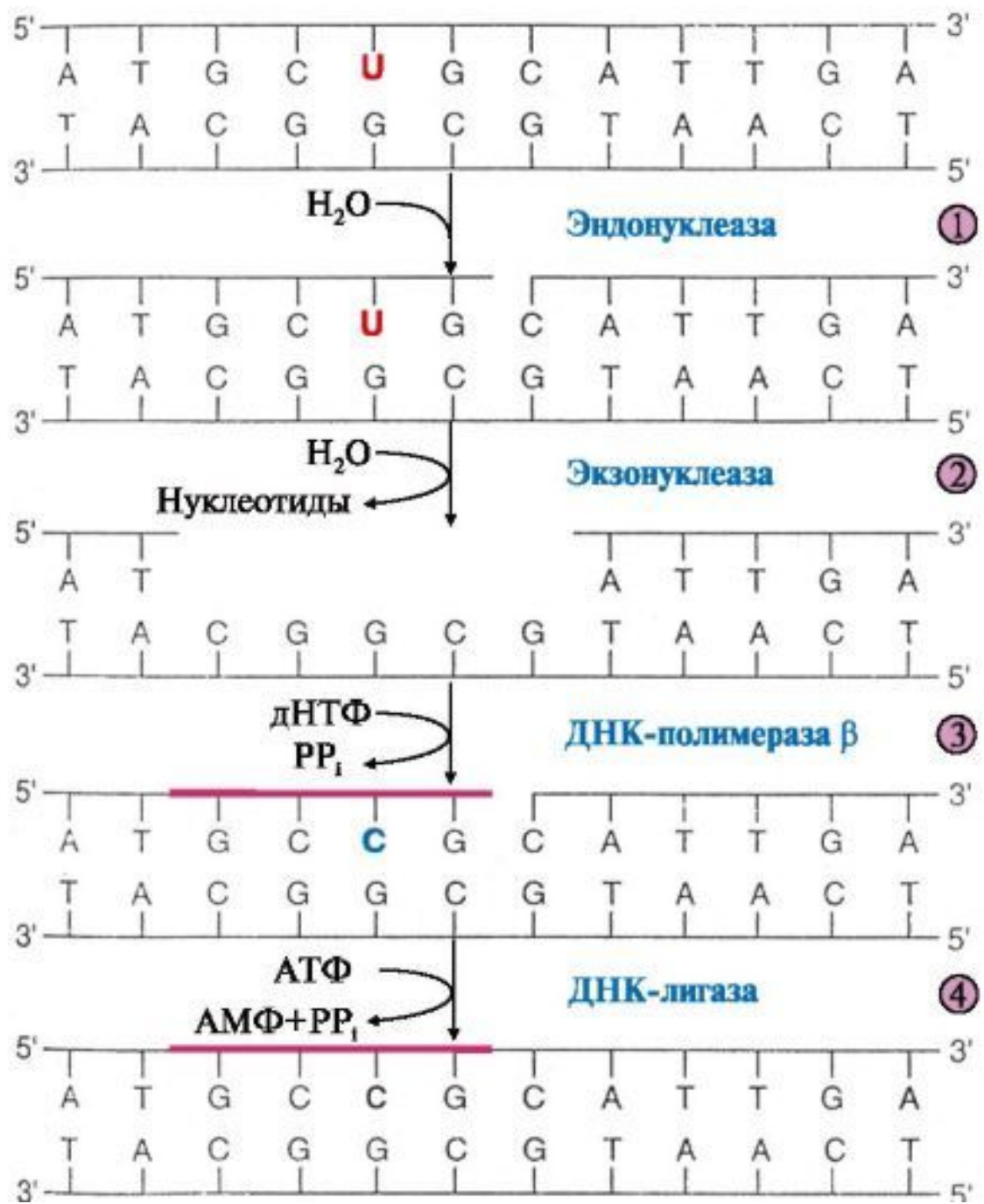


4. Эра управляемого биосинтеза (1961 – 1975 гг.).

Период расширения круга промышленно производимых микробных продуктов, включающий микробиологическое производство аминокислот (*глутамин и лизин*), разработку методик производства микробного белка, производство ферментов (*протеазы, амилазы, глюкозоизомеразы*), промышленное применение иммобилизованных ферментов (*глюкозоизомераза*), производство бактериальных полисахаридов (*ксантан*).

Производство микробного белка в эти годы получает крупномасштабное развитие. При этом микроорганизмы выращивают на газах, нефти, отходах угольной, химической, пищевой, винно-водочной, деревообрабатывающей промышленности.

Не менее важным достижением биотехнологии в этот период стало получение биогаза, открытие ферментов **рестриктазы** и **лигазы**, позволяющих разрезать и сшивать молекулу ДНК.



5. Эра новой биотехнологии (после 1975 г.).

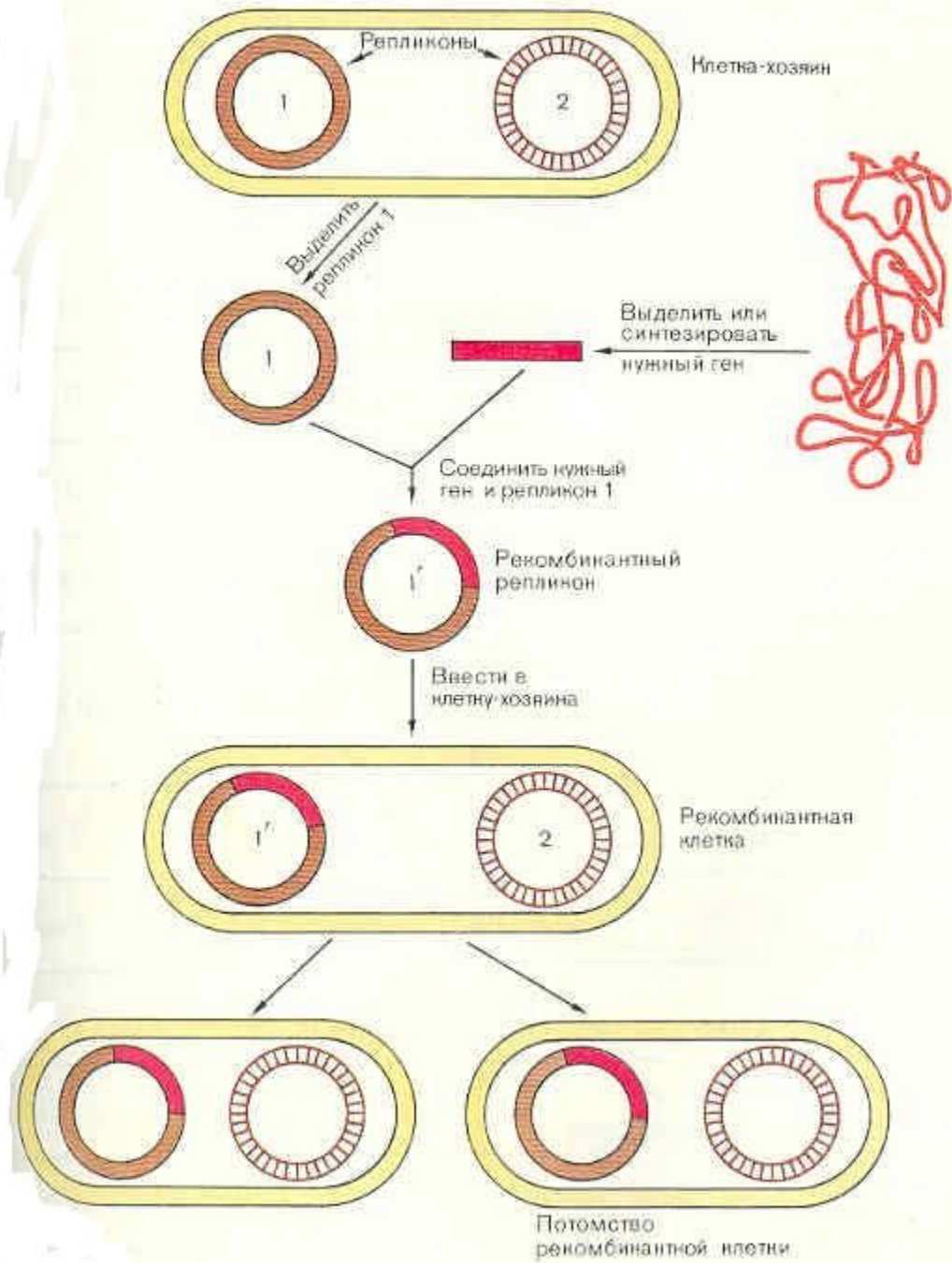
Этот этап стал возможным после эпохального открытия Д. Уотсона и Ф. Крика строения молекулы ДНК. Главными объектами исследований становятся живая клетка и молекула ДНК.

Важнейшим достижением биотехнологии является генетическая трансформация, перенос чужеродных донорских генов в клетки-реципиенты микроорганизмов, получение трансгенных организмов с новыми или усиленными традиционными свойствами и признаками.

В 1988 г. был разработан метод полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Работы с рекомбинантными молекулами ДНК позволили создать бактериальные штаммы-продуценты всех типов интерферонов, продуценты гормона роста человека и ряда животных, инсулина человека и т.д.

Интенсивно развивается направление иммобилизации ферментов и клеток на специальных носителях, что обеспечивает их многократное использование.



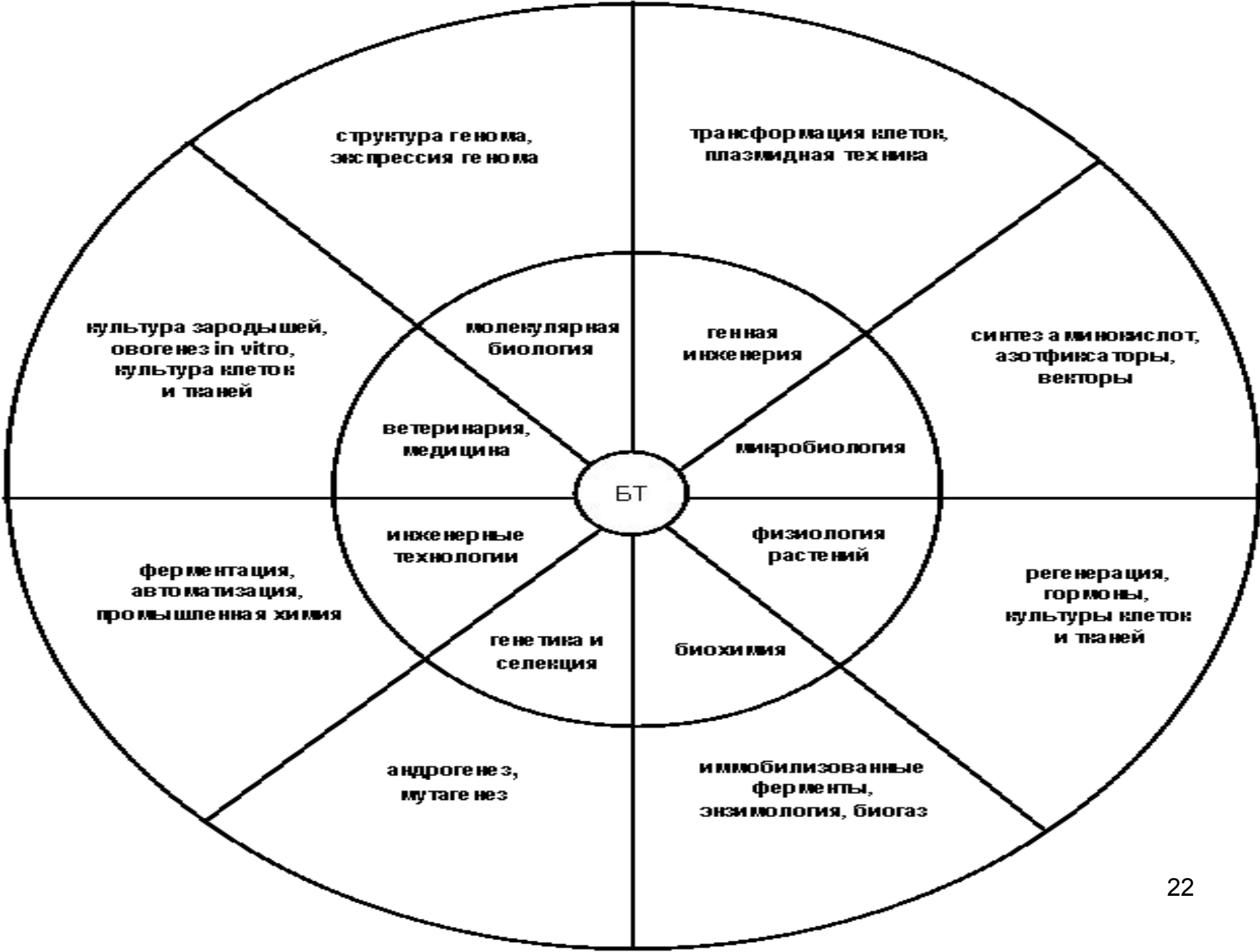
В биотехнологии выделяют *медико-фармацевтическое, продовольственное, сельскохозяйственное и экологическое направления*. В соответствии с этим биотехнологию можно условно разделить на *медицинскую, сельскохозяйственную, промышленную и экологическую*.

Перспективы развития биотехнологии в различных отраслях:

- В промышленности (пищевая, фармацевтическая, химическая, нефтегазовая): использование биосинтеза и биотрансформации веществ на основе сконструированных методами генной инженерии штаммов бактерий и дрожжей с заданными свойствами;
- В сельском хозяйстве: биологических средств защиты растений, биоудобрений и регуляторов роста, микробиологических методов рекультивирования почв; в области животноводства – получение вакцин и сывороток, создание эффективных кормовых препаратов из микробной биомассы и отходов сельского хозяйства;

- В медицине: разработка медицинских биопрепаратов, диагностикумов, вакцин, развитие иммунобиотехнологии;
- В экологии: разработка экологически безопасных технологий очистки сточных вод, утилизация отходов, конструирование экосистем;
- В энергетике: применение новых источников биоэнергии, биоконверсия биомассы в биогаз и биотопливо.

Поэтому несмотря на то, что большие материальные затраты и длительное время уходит на фундаментальные исследования, основной целью биотехнологии является получение целевого продукта, рентабельного производства и, следовательно, того, что необходимо людям в большей или меньшей степени.



Биотехнологическое производство

Выделяют 5 стадий, этапов, или операций, биотехнологического производства.

Две начальные стадии включают подготовку необходимой культуры микроорганизма-продуцента (т. е., биологически действующего начала) и сырья. При осуществлении микробиологического синтеза необходимы стадии приготовления питательной среды и поддержания чистой культуры, которая могла бы постоянно или по мере необходимости использоваться в процессе.

Третья стадия - стадия ферментации, на которой происходит образование целевого продукта. На этой стадии идет микробиологическое превращение компонентов питательной среды сначала в биомассу, затем, если это необходимо, в целевой метаболит.

На четвертом этапе из культуральной жидкости выделяют и очищают целевые продукты. Процессы выделения и очистки, часто занимающие важное место среди др. технологических операций, определяются химической природой получаемого вещества и могут включать экстракционные и хроматографические методы, кристаллизацию, фильтрацию, осаждение и др.

Заключительная стадия промышленного производства - приготовление товарных форм продуктов. Общим свойством большинства продуктов микробиологического синтеза является их недостаточная стойкость к хранению, следовательно, на заключительной стадии производства крайне важны способы стабилизации и консервации целевых продуктов.



Центральной среди этапов промышленного производства является **стадия ферментации**. Под ферментацией понимают всю совокупность последовательных операций от внесения в заранее приготовленную и термостатированную среду инокулята до завершения процессов роста, биосинтеза или биотрансформации.

Выбор биотехнологических объектов

Принципы подбора биотехнологических объектов

Штамм-продуцент должен характеризоваться следующими свойствами:

- 1) способностью расти в чистой культуре и генетической стабильностью;
- 2) отсутствием патогенности и токсичности;
- 3) высокой скоростью роста при массовом культивировании и способностью синтезировать продукт в большом количестве и за короткий промежуток времени (до 3 суток);
- 4) устойчивостью к контаминации (например, за счет изменения физико-химических условий среды, способности к росту при повышенных температурах или к синтезу антибиотиков);
- 5) способности расти на простых и дешевых питательных средах.

Биотехнологическое использование микроорганизмов

условно можно разбить на несколько основных групп:

- 1) получение живой или инактивированной микробной биомассы (производство пекарских, винных, кормовых дрожжей; вакцин, белково-витаминных концентратов, средств защиты растений, заквасок для получения кисломолочных продуктов и силосования кормов, почвоудобрительных препаратов и т.д.);
- 2) получение продуктов метаболизма микроорганизмов (антибиотики, гормоны, аминокислоты, витамины, органические кислоты и т.д.);
- 3) получение ферментов микробного происхождения;
- 4) получение рекомбинантных продуктов;
- 5) биотрансформация веществ;
- 6) утилизация неприродных соединений.

Биотехнологические объекты находятся на разных ступенях организации:

- а) субклеточные структуры (вирусы, плазмиды, ДНК митохондрий и хлоропластов, ядерная ДНК);
- б) бактерии и цианобактерии;
- в) грибы;
- г) водоросли;
- д) гетеротрофные протисты;
- е) культуры клеток растений и животных;
- ж) растения.

Во многих биотехнологических процессах используется ограниченное число микроорганизмов, которые классифицируются как **GRAS** («generally recognized as safe») и обычно считаются безопасными. К таким микроорганизмам относят бактерии *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, другие виды бацилл и лактобацилл, виды *Streptomyces*. Сюда также относят виды грибов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* и дрожжей *Saccharomyces* и др. GRAS-микроорганизмы непатогенные, нетоксичные и в основном не образуют антибиотики, поэтому при разработке нового биотехнологического процесса следует ориентироваться на данные микроорганизмы, **как базовые объекты биотехнологии.**

При столь большом разнообразии микробов возникает вопрос, каким образом подобрать именно те формы, продукция которых интересует?

Для этого можно использовать *классический путь* — проводится выделение микроорганизмов из мест, где обитание того или иного продуцента наиболее вероятно.

Другой путь подбора микроорганизмов — из имеющихся *коллекций микроорганизмов*.

Главным критерием при отборе продуцентов является способность микроорганизмов синтезировать целевой продукт.

Правильный выбор микроорганизмов-продуцентов имеет определяющее значение, поскольку гарантирует стабильное получение заданного целевого продукта. Наиболее часто для этих целей используются прокариотические микроорганизмы и дрожжевые грибы.

В большинстве случаев для достижения целей биотехнологического производства используются *оптимизированные* (а не выделенные непосредственно из природных источников или коллекций) штаммы микроорганизмов, позволяющие понизить стоимость производства вследствие повышения их продуктивности и приобретения более специфических свойств.

К основным методам оптимизации, используемым в промышленной биотехнологии, относят мутагенез, селекцию и метаболическую инженерию, приводящую к изменению ферментативных, транспортных и регуляторных свойств клеток, которое способствует оптимизации клеточной активности.

Селекция. Неотъемлемым компонентом в процессе создания наиболее ценных и активных продуцентов, т. е, при подборе объектов биотехнологии, является их селекция. А основным путем селекции является ***сознательное конструирование геномов*** на каждом этапе отбора нужного продуцента.

В развитии микробных технологий очень важную роль играют методы, базирующиеся на селекции спонтанно возникающих измененных вариантов, характеризующихся нужными полезными признаками. При таких методах обычно используется ***ступенчатая селекция***: на каждом этапе из популяции микроорганизмов отбираются наиболее активные варианты (спонтанные мутанты), из которых на следующих этапах отбирают новые, более эффективные штаммы.

Несмотря на низкую частоту возникновения мутантов, возможности метода очевидны.

Процесс создания наиболее эффективных продуцентов значительно ускоряется при использовании **индуцированного мутагенеза**. В качестве мутагенных воздействий применяются физические, химические и биологические факторы.

Однако и этот прием также не лишен недостатков, главным из которых является его трудоемкость и отсутствие сведений о характере возникающих изменений, поскольку отбор ведется по конечному результату. Например, устойчивость организма к ионам тяжелых металлов может быть связана с подавлением системы поглощения данных ионов микробной клеткой, активацией процесса их удаления из клетки или перестройкой системы (систем), которая подвергается ингибирующему действию иона в клетке. Естественно, знание механизмов повышения устойчивости позволит вести направленное воздействие с целью получения конечного результата за более короткое время, а также отбирать варианты, наиболее подходящие к конкретным условиям производства.

Отбор микроорганизмов для биотехнологического производства или создание новых штаммов часто направлены на усиление их продукционной способности, т.е. образование того или иного продукта.

Решение этих задач связано с изменением регуляции биохимической активности микробной клетки. Как известно, изменения скорости биохимических реакций у микроорганизмов может осуществляться по крайней мере двумя путями.

Первый из них (очень быстрый, реализующийся в течение нескольких минут) заключается в изменении каталитической активности индивидуальных молекул фермента.

Второй, более медленный (реализуется в течение многих минут), состоит в изменении скорости синтеза ферментов. В обоих механизмах используется единый принцип управления системами – принцип обратной связи, хотя существуют и более простые механизмы регуляции активности метаболизма клетки.



Рис. Схема селекции микроорганизмов

Таким образом, тенденцией сегодняшнего дня является сознательное конструирование штаммов микроорганизмов с заданными свойствами на основе фундаментальных знаний о генетической организации и молекулярно-биологических механизмах осуществления основных процессов жизнедеятельности.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ