**ЛЕКЦИЯ 2. ПРОДУЦЕНТЫ И ИХ СЕЛЕКЦИЯ**

**Штамм -** микроорганизмы одного вида, выращенные в определенных условиях, вследствие чего обладающие определенными свойствами, и отличающиеся от других чистых культур данного вида.

**Микроорганизмы-продуценты -** микроорганизмы, обладающие способностью под воздействием внешних факторов (состава среды, условий культивирования, температуры, рН среды и т.д.) образовывать в больших количествах преимущественно то соединение, которое является главным (целевым) продуктом данного производства.

**Селекция** - это направленный отбор мутантов, то есть микроорганизмов, наследственные признаки которых претерпели изменения в нужном для человека направлении.

**Сверхсинтез** - способность микроорганизмов синтезировать определенный продукт в количествах, превосходящих физиологические потребности.

**Мутагенез** - естественный или искусственный (индуцированный) процесс, приводящий к возникновению мутаций в организме. Используется для создания мутантных организмов для нужд биотехнологии.

**Генная (генетическая) инженерия** - совокупность методов и технологий, в том числе технологий получения рекомбинантных РНК и ДНК, по выделению генов из организма, осуществлению манипуляций с генами и введению их в другие организмы.

**Понятие о микроорганизмах-продуцентах. Требования, предъявляемые к промышленным штаммам. Выбор исходного штамма**

В биотехнологии обычно используются чистые культуры микроорганизмов-продуцентов, так как это позволяет получить продукт с заранее известными свойствами.

К *микроорганизмам-продуцентам* предъявляется ряд обязательных требований. Микроорганизмы должны:

* расти на дешевых и доступных питательных средах;
* максимально усваивать питательные вещества среды;
* обладать высокой скоростью роста биомассы и давать высокий выход целевого продукта;
* проявлять синтетическую активность, направленную в сторону получения желаемого продукта; образование побочных продуктов должно быть незначительным;
* быть генетически однородными, стабильными в отношении продуктивности, требований к питательному субстрату и условиям культивирования;
* быть устойчивыми к фагам и другой посторонней микрофлоре;
* быть безвредными для людей (не обладать патогенными свойствами) и для окружающей среды;
* образуемый продукт должен иметь экономическую ценность и легко выделяться.

Выгодным объектом для биотехнологии являются термофильные, ацидофильные (или алкалофильные) штаммы, поскольку с ними легче поддерживать стерильность в производстве. Интерес представляют анаэробные микроорганизмы, так как для культивирования аэробов требуется аэрирование.

***Подбор продуцентов*** можно осуществить:

* путем изолирования микробов из природных источников, для этого отбираются пробы из мест, где обитание того или иного продуцента наиболее вероятно. Например, углеводородокисляющие микроорганизмы из почвы возле бензоколонок, винные дрожжи из винограда, анаэробные целлюлозоразлагающие и метанобразующие микроорганизмы из рубца жвачных животных. Образцы проб вносят в жидкие питательные среды специального состава, получая *накопительные культуры* микроорганизмов. Затем выделяют *чистые культуры*, используя плотные питательные среды, на которые засевают образцы проб из накопительных культур;
* из имеющихся коллекций микроорганизмов, при этом руководствуются физиологическими и биохимическими свойствами различных групп микроорганизмов. Например, продуцентов антибиотиков находят среди актиномицетов, внеклеточное выделение гидролитических ферментов характерно для грамположительных бактерий, основные продуценты этанола - дрожжи и т.д.

**Селекция микроорганизмов – продуцентов практически важных веществ. Задачи селекции.**

Выделение и подбор объекта - важный этап биотехнологического процесса. Однако путем простого подбора не удается получить высокоактивные продуценты, поэтому возникает задача изменения природы организма в нужном направлении. Для этого используют методы *селекции.* С их помощью получены промышленные штаммы микроорганизмов, синтетическая активность которых превышает активность исходных штаммов в десятки и сотни раз.

К продуктам микробного брожения и метаболизма микроорганизмов относятся первичные метаболиты, вторичные метаболиты, ферменты и сама клеточная биомасса (так называемые белки одноклеточных микроорганизмов).

**Первичные метаболиты** - это низкомолекулярные соединения (молекулярная масса менее 1500 дальтон), необходимые для роста микробов; одни из них являются строительными блоками макромолекул, другие участвуют в синтезе коферментов. Среди наиболее важных для промышленности метаболитов можно выделить аминокислоты, органические кислоты, пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды, витамины и др.

**Вторичные метаболиты** - это низкомолекулярные соединения, образующиеся на более поздних стадиях развития культуры, не требующиеся для роста микроорганизмов. По химическому строению вторичные метаболиты относятся к различным группам соединений. К ним относят антибиотики, алкалоиды, гормоны роста растений, токсины и пигменты.

Однако природные штаммы микроорганизмов не обладают способностью выделять и накапливать в питательной среде, то есть продуцировать, такое количество нужного продукта, которое обеспечило бы низкую его стоимость и требуемый объем производства. Первичные метаболиты микроорганизмов не выделяются в среду в больших количествах, так как синтезируемое количество этих веществ строго ограничено и рассчитано на потребности самой клетки. Исключение из этого правила - выделение глутаминовой кислоты природными штаммами коринебактерий.

Поэтому задачей селекции является не только усиление природной способности микроорганизмов продуцировать определенное вещество (ферменты, антибиотики, аминокислоты и т.д.), но во многих случаях и создание продуцента «заново» из штамма дикого типа, способного синтезировать вещество (например, аминокислоту), но не способного его продуцировать. Эти задачи осуществляются получением у природных штаммов наследственных изменений - **мутаций**, приводящих к усилению природной способности микроорганизмов синтезировать и продуцировать определенное вещество, а также появлению новой способности - синтезировать вещество в избытке (сверх своих потребностей) и продуцировать его.

**Методы селекции**

Изменчивость признаков микроорганизмов, обусловленная перестройкой генетического аппарата, проявляется в виде мутаций и генетических рекомбинаций.

**Мутации** - внезапные, скачкообразные изменения генов. Процесс мутирования приводит к таким изменениям, которые передаются по наследству. Они сохраняются даже тогда, когда вызвавший их фактор перестает действовать.

*Спонтанные мутации* (без направленного воздействия) очень редки: примерно одна на 100 тыс. Они характеризуются изменением какого-нибудь одного признака и обычно стабильны.

При спонтанных мутациях высевают большое количество клеток на среду, где рост исходного штамма невозможен. Далее из выросших колоний микроорганизмов отбирают наиболее высокоэффективные формы - *ступенчатый отбор.*

Так получают мутанты, усваивающие новые субстраты, устойчивые к фагам, антибиотикам, рН, температуре. Таким путем за длительное время были отобраны штаммы пивных, винных, хлебопекарных дрожжей, уксуснокислых, молочнокислых, пропионовокислых бактерий. Селекционные работы такого рода могут занимать многие годы. Ограниченность применения спонтанных мутаций связана с их низкой частотой, что затрудняет интенсификацию процесса.

К значительному ускорению селекции ведет **индуцированный мутагенез*,*** то есть воздействие факторов физической, химической и биологической природы, способных вызвать мутации. К универсальным *физическим мутагенам* относятся ультрафиолетовое облучение (УФО), рентгеновские лучи и др.; *химические факторы* *мутагенного воздействия* - азотистый иприт, нитрозамины, четыреххлористый углерод и другие химикаты; *биологическими мутагенами* являются фаги (вирусы микроорганизмов).

Обработанную мутагеном культуру рассеивают на плотную питательную среду. Затем исследуют каждую колонию на продуктивность и, выделив более продуктивный вариант, процедуру мутагенеза и отбора повторяют, то есть проводят ступенчатый отбор.

Недостатки метода: 1) трудоемкость; 2) отсутствие сведений о характере мутаций, так как отбор проводится по конечному результату; 3) в процессе многократного мутагенеза кроме положительных мутаций накапливаются вредные мутации.

Так как мутации образуются случайным образом, поэтому более широко используется **генная,** или **генетическая, инженерия** - генетическая рекомбинация in vitro (в пробирке). *Рекомбинация* - это обмен генами между двумя хромосомами. Рекомбинантными ДНК называют молекулы ДНК, полученные вне живой клетки, в пробирке, путем соединения природных или синтетических фрагментов ДНК с молекулами, способными реплицироваться (удваиваться) в клетке. Этот подход был разработан на бактериях, в частности на кишечной палочке, в клетки которой вводили гены животных и человека и добивались их репликации. Метод рекомбинации in vitro заключается в выделении ДНК из разных видов, получении гибридных молекул ДНК и введении рекомбинантных молекул в живые клетки с целью проявления нового признака, например, синтеза специфического белка.

Генетические рекомбинации у эукариот - это образование индивидуумов с новым сочетанием свойств в результате полового процесса. У прокариот комбинативные изменения проявляются в результате трансформации, трансдукции и конъюгации.

*Трансформация -* перенос генетической информации от бактерии донора (в форме отдельных фрагментов ее ДНК) в клетку реципиента. Наиболее эффективно трансформация происходит у бактерий одного и того же вида или близкородственных видов. При этом в хромосому реципиента включается только одна нить ДНК донора с образованием молекулярной гетерозиготы.

Обычно бактериальная клетка в результате трансформации приобретает одно свойство. С помощью трансформирующей ДНК передаются такие признаки, как капсулообразование, ферментативная активность, устойчивость к ядам, антибиоти-кам и т.д.

*Трансдукция -* перенос генов (фрагментов ДНК) от донорской клетки бактерии к реципиентной посредством умеренного фага.

При трансдукции возможен перенос генов, контролирующих особенности питания бактерий, двигательный аппарат (жгутики) и другие свойства.

*Конъюгация* - форма полового процесса, при котором происходит соединение мужской и женской микробных клеток и обмен между ними ядерным веществом через цитоплазматический мостик, образующийся между клетками.

В результате генетических рекомбинаций образуются новые гибридные или рекомбинантные клетки, сочетающие свойства родительских форм.

Возможности получения новых штаммов микроорганизмов, обладающих способностью к сверхсинтезу целевого продукта, можно рассмотреть на примере продуцента антибиотика пенициллина. Изначально штамм Penicillium chrysogenum (NRRL-1951) производил 60 мг/л пенициллина. После спонтанной мутации возник новый штамм (NRRL-1951ּВ25) с выходом пенициллина 150 мг/л. После рентгеновского облучения был отобран мутант (Х-1612), дающий 300 мг/л пенициллина. После нескольких циклов мутагенеза и селекции, в которых помимо УФО применяли иприт, удалось вывести высокопродуктивный штамм (Е-15ּ1), который производил 7 г/л пенициллина. Таким образом, 21 цикл мутагенеза и селекции в течение более двух десятков лет позволил увеличить выход пенициллина в 55 раз. В настоящее время новые штаммы микроорганизмов-продуцентов дают выход более 20 г/л пенициллина.

**Методы консервации штаммов-продуцентов**

Полученные в ходе селекции продуценты часто являются нестабильными и способны к непроизвольному обратному мутированию. Длительное хранение клеток без утраты ценных свойств возможно, если резко затормозить все протекающие в них жизненные процессы, в том числе и генетические перестройки. Для этого культуры переводят в состояние анабиоза. По степени приближения к этому состоянию существующие методы хранения различаются на следующие.

**1.****Лиофильное высушивание** - обезвоживание под вакуумом после замораживания при температуре -40…-60 оС и ниже. Например, этот метод применяется для сохранения продуцентов антибиотиков. Однако лиофилизацию переносят далеко не все биообъекты. Находясь в лиофилизованном состоянии, менее жизнестойкие клетки отмирают, популяция обогащается более жизнеспособными.

**2. Высушивание** на воздухе в стерильной почве, песке, на активированном угле, на семенах некоторых растений, на дисках агар-агара, на бумаге, шерстяных нитках и других носителях. Этот метод прост в обращении, но он недостаточно задерживает происходящие в популяции нежелательные генетические изменения.

**3.** **Сохранение спор** - метод пригоден для спорообразу-ющих бактерий. Споры представителей рода Bacillus хранятся в течение многих лет.

**4. Криоконсервация** - глубокое замораживание клеток с их последующим хранением в жидком азоте (-196 оС) или его парах (-150 оС). Таким путем можно сохранить в течение долгого времени объекты, не выдерживающие другие методы хранения. Создаются коллекции ценных организмов в глубоко замороженном состоянии. Криоконсервация практически полностью предотвращает «порчу» генного фонда популяций клеток, реализуя наиболее полно состояние анабиоза.

**5. Комбинированные методы** **хранения.** В некоторых случаях наибольшая сохранность ценных свойств достигается с применением комбинации нескольких методов хранения. Например, частичное высушивание клеток способствует сохранению их жизнеспособности и биохимической активности при последующей лиофилизации или низкотемпературном хранении.

Подводя итог по изложенной теме, отметим следующее. Из более чем 100 тыс. известных микроорганизмов в промышленности используют около 100 видов, поэтому одной из задач биотехнологии является расширение набора микроорганизмов-продуцентов. Этого можно добиться методами селекции и генной инженерии. Кроме того, стоит задача сохранения новых свойств полученных штаммов, для чего используются различные методы консервации.