

## Лекция 2

### Принципы подбора исходного объекта для селекции продуцента.

Промышленные штаммы. Принципы отбора штамма-продуцента. Требования, предъявляемые к промышленным штаммам. Роль генетической инженерии в создании и совершенствовании биологических агентов. Подготовка исходного штамма к селекции.

### 2.1 ПОДБОР ИСХОДНОГО МИКРООРГАНИЗМА ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ

Все клеточные метаболиты можно разделить на три группы:

- 1 Молекулы с большой, до нескольких миллионов, молекулярной массой (ферменты и полисахариды).
- 2 Первичные метаболиты, соединения, необходимые для роста клетки (аминокислоты, нуклеотиды, витамины и др.).
- 3 Вторичные метаболиты, соединения, которые не требуются микроорганизмам для роста (антибиотики, алкалоиды и др.).

Для того чтобы осуществлять промышленный синтез биологически активных веществ и иметь рентабельное производство штаммы-продуценты должны продуцировать в среду достаточное количество метаболита. Однако, как было отмечено выше, природные штаммы микроорганизмов, как правило, неспособны выделять и накапливать в питательной среде такое количество продукта, которое могло бы обеспечить достаточно низкую себестоимость при производстве. Так, некоторые природные штаммы грибов, актиномицетов и бацилл способны продуцировать небольшое количество антибиотиков, токсинов, гидролитических ферментов. Однако в отношении первичных метаболитов этого не наблюдается, поскольку эти биосинтетические пути настолько жестко зарегулированы в клетке, что синтезируемое количество данных метаболитов строго соответствует потребностям самой клетки.

Поэтому перед селекционерами стоит задача правильно подобрать исходный микроорганизм для селекции.

Микроорганизмы, которые являются природными продуцентами даже небольшого количества того или иного метаболита, являются исходными штаммами для селекции продуцента этого вещества. Дальнейшая работа направлена на повышение уровня продукции метаболита путем получения мутаций, усиливающих продукционную способность отобранного микроорганизма.

В том случае, если создается продуцент первичного метаболита и клетки микроорганизмов не способны накапливать продукт в питательной среде, продуцент создается из штаммов дикого типа. Здесь в первую очередь нужно учитывать ограничения для сверхсинтеза определенного вещества. Например, у представителей глутаматпродуцирующих бактерий *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum* получены высокие уровни продукции лизина, а у бактерий рода *Pseudomonas* или *E. coli* этот уровень значительно ниже. Это обстоятельство объясняется различной регуляцией пути синтеза аминокислоты у этих микроорганизмов. Так, у *Corynebacterium glutamicum* и *Brevibacterium flavum* синтез лизина контролируется только на уровне ретроингибирования одного фермента лизином и треонином (рис. 1). Причем этот контроль легко устраняется мутацией, блокирующей синтез гомосерина - предшественника треонина и метионина. При этом поток общих предшественников направляется на синтез лизина. У бактерий рода *Pseudomonas* и *E. coli* этот биосинтетический путь жестко зарегулирован: имеется 3 контролируемых на уровне терминации транскрипции структурных гена, а у псевдомонад еще и сложная система аллостерической регуляции (рис. 2). Кроме того, у коринебактерий отсутствует система деградации лизина, тогда как у псевдомонад эта система выражена очень ярко.

Таким образом, выбор штаммов-продуцентов вторичных метаболитов основан на поиске природных штаммов, способных выделять в среду некоторое количество продукта. Выбор же продуцентов первичных метаболитов основан на подборе штаммов, имеющих менее сложные по сравнению с другими микроорганизмами системы регуляции метаболита с последующим введением в геном потенциального продуцента мутаций, которые теоретически могут вызвать сверхсинтез продукта.

Таким образом, **выбор исходного штамма зависит:**

- 1) от природных свойств штамма;
- 2) ограничений, связанных со сложностями систем регуляции синтеза как на генетическом, так и на аллостерическом уровнях.

## 2.2 ПОДГОТОВКА ИСХОДНОГО ШТАММА К СЕЛЕКЦИИ

Штамм микроорганизма, способный продуцировать даже небольшое количество того или иного метаболита и отобранный для селекции, вовлекается в дальнейшую работу по изучению его естественной изменчивости по морфологическим и количественным признакам. Это длительная процедура, включающая много этапов.

- Исходный штамм рассеивают на чашки Петри и отбирают несколько сотен клонов, имеющих типичную для данной культуры морфологию и варианты с некоторыми морфологическими отклонениями.

- Производят несколько пассажей для подтверждения того, что эти варианты сохраняют свои морфологические особенности.

- Оценивают уровень продукции интересующего метаболита у вариантов с типичной для данной культуры морфологией и с некоторыми морфологическими отклонениями. Такая оценка дает возможность выявить корреляцию между особенностями морфологии клонов и уровнем продукции метаболита.

- Несколько клонов с наиболее высоким уровнем продукции по отношению к уровню контроля (которым служит исходная не рассеивавшаяся культура) отбирают и проверяют на продукцию в нескольких повторах, а затем отбирают один клон, имеющий устойчиво высокий уровень продукции. Такая длительная процедура называется «чисткой исходной культуры» и приводит к отбору клона с заметно повышенной продукцией, а иногда - и с морфологическими отклонениями.

- Отобранный клон снова рассеивают и оценивают его уровень продукции путем анализа не менее 100 типичных клонов. Значения уровней продукции таких субклонов выражают в процентах по отношению к продукции исходного (родительского) и располагают в вариационном ряду 1, вычисляя для них статистические показатели:

- среднее арифметическое ( $\bar{X}$ );
- квадратическое отклонение ( $\sigma$ );
- коэффициент изменчивости ( $\sigma^v = \sigma \times 100$ ).

- Субклоны, попавшие в крайнюю правую часть этого ряда (максимальная продукция), отбирают и опять оценивают по уровню продукции. При этом отбирается только один из них.

- Этот субклон опять рассеивают и, проверив, не менее 100 высеянных клонов, строят вариационный ряд 2, вычисляя его показатели. Сравнивают показатели коэффициента изменчивости двух вариационных рядов.

Если эти значения существенно не отличаются, то подготовку исходного для селекции штамма заканчивают, отбирая субклоны из 1-го вариационного ряда, а 2-й ряд (собственный ряд этого субклона) считают контрольным. Если при сравнении коэффициентов изменчивости у 2-го ряда наблюдается его уменьшение, то целесообразно провести еще один этап клонирования, выбрав из правой части 2-го ряда «лучший клон». Построить на его основе 3-й вариационный ряд и определить его коэффициент. Если значения коэффициентов изменчивости 2-го и 3-го рядов не отличаются, то клонирование прекращают, а если опять наблюдаются отличия, то продолжают процедуру.

■ Цель ступенчатого клонирования - «стабилизировать» исходную культуру по количественному признаку, получив на основе действия стабилизирующего отбора наиболее однородную по данному признаку популяцию. Эта популяция будет служить надежным контролем индуцируемой мутагенами изменчивости при последующем отборе мутантов.

■ Однако однородность отобранной культуры снижается при многократном пассировании и длительном хранении. Поэтому отобранную контрольную культуру необходимо поддерживать периодическим клонированием. Повысить уровень продукции таким клонированием, т. е. отобрать мутант практически невозможно.

■ В том случае, когда исходная культура не продуцирует требуемого вещества, выбирают из ее рассева клон, который по таксономической характеристике полностью соответствует данному виду микроорганизма и используют этот клон для дальнейшей работы.

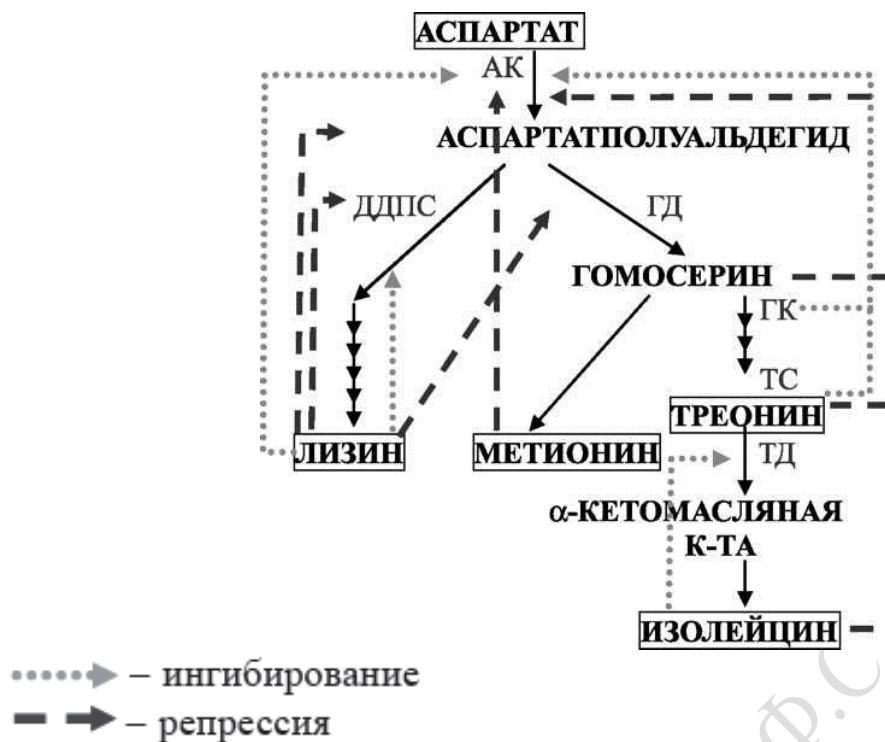
### **2.3 ТРЕБОВАНИЯ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫЕ К ПРОМЫШЛЕННЫМ ШТАММАМ**

Штаммы микроорганизмов, используемые в производстве, должны отвечать некоторым промышленным стандартам, а именно:

- обладать подходящими технологическими характеристиками: высокой продуктивностью, высокой скоростью роста (коэффициентом выхода биомассы), температурной устойчивостью, кислотной устойчивостью;
- фагоустойчивостью;
- генетической стабильностью;
- расти на рентабельных (дешевых и доступных) субстратах;
- продукты микробиологического синтеза должны быть экологически безвредны для человека и окружающей среды.

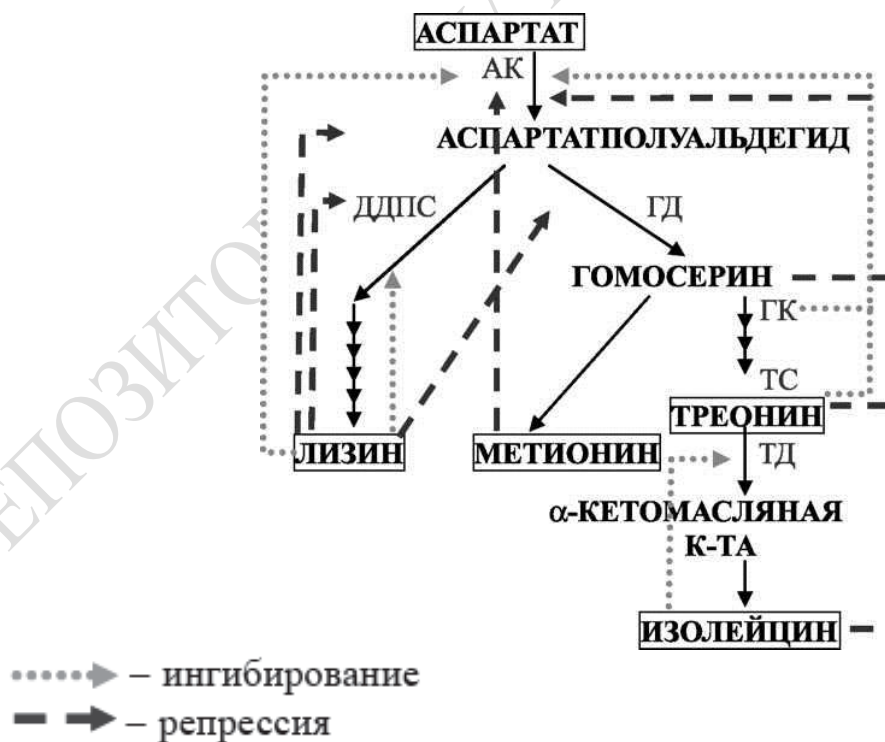


Рис. 2. Регуляция биосинтеза лизина и треонина у *E. coli*:  
 АК - аспараткиназа; ДДПС - дигидродипиколинатсинтаза;  
 ГД - гомосериндегидрогеназа; ГК - гомосеринкиназа;  
 ТС - треонинсинтаза; ТД - треониндезаминаза



**Рис. 2.** Регуляция биосинтеза лизина и треонина у *E. coli*:

АК - аспараткиназа; ДДПС - дигидродипиколинатсинтаза;  
 ГД - гомосериндегидрогеназа; ГК - гомосеринкиназа;  
 ТС - треонинсинтаза; ТД - треониндезаминаза



**Рис. 2.** Регуляция биосинтеза лизина и треонина у *E. coli*:

АК - аспараткиназа; ДДПС - дигидродипиколинатсинтаза;  
 ГД - гомосериндегидрогеназа; ГК - гомосеринкиназа;  
 ТС - треонинсинтаза; ТД - треониндезаминаза

*Рис. 1. Регуляция биосинтеза лизина и треонина у Br. flavum:*  
АК - аспараткиназа; ДДПС - дигидродипиколинатсинтаза; ГД -  
гомосериндегидрогеназа; ГК - гомосеринкиназа;  
ТС - треонинсинтаза; ТД - треониндезаминаза  
- ингибирование  
—▶ - репрессия

.....▶ - ингибирование  
- ▶ - репрессия  
- ингибирование  
“ —▶ - репрессия

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф.СКОРИНЫ