

Создание штаммов микроорганизмов для биотехнологии

Дебабов

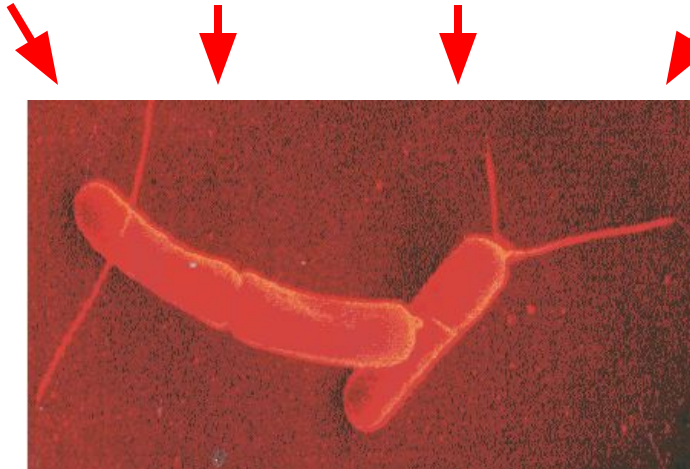
Владимир Георгиевич

debabov@genetika.ru

***Escherichia coli* :** **потенциал для биотехнологии**

Источники питания:

глюкоза аммиак фосфаты сульфаты



**Время удвоения –
30 мин**

Продукты клетки:

4 291 генов

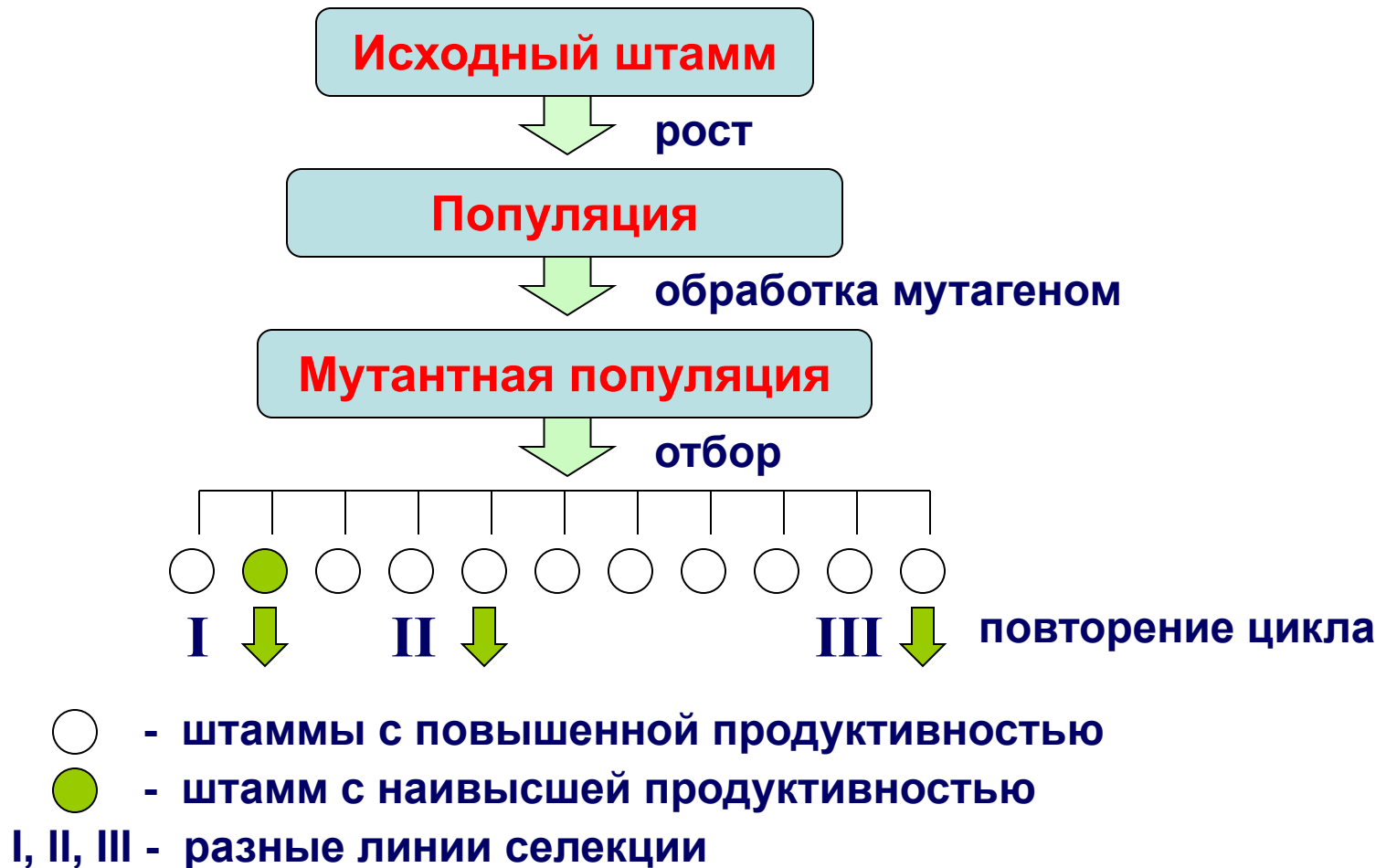
900 метаболитов

2 350 000 молекул белка

10^{14} – 10^{16} реакционных событий

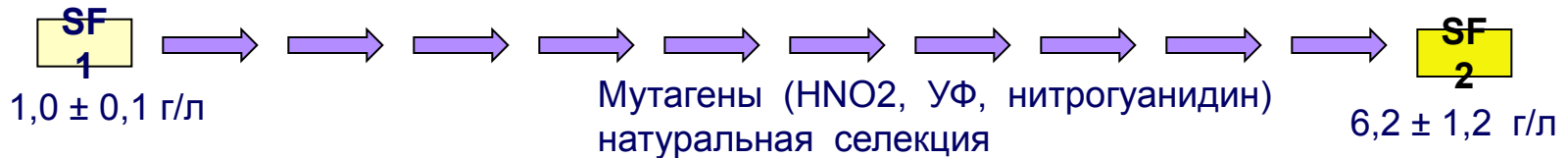
Схема традиционной ступенчатой селекции

CSI - classical strain improvement / CSS - classical strain selection



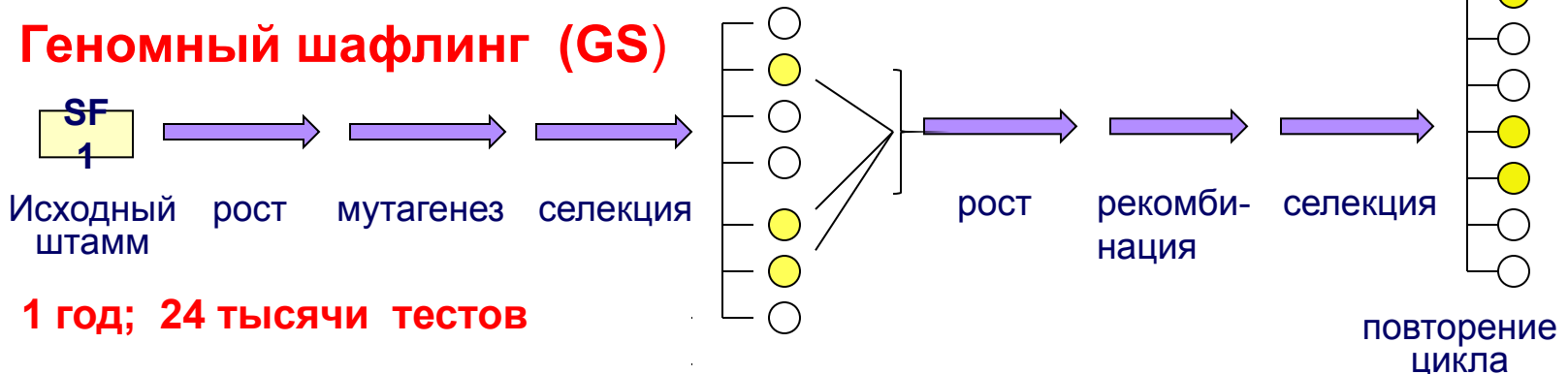
Селекция продуцентов антибиотика тилозина *Streptomyces fradie*

CSS - метод (20 циклов мутагенеза и отбора)



20 лет; 1 миллион тестов

Геномный шафлинг (GS)

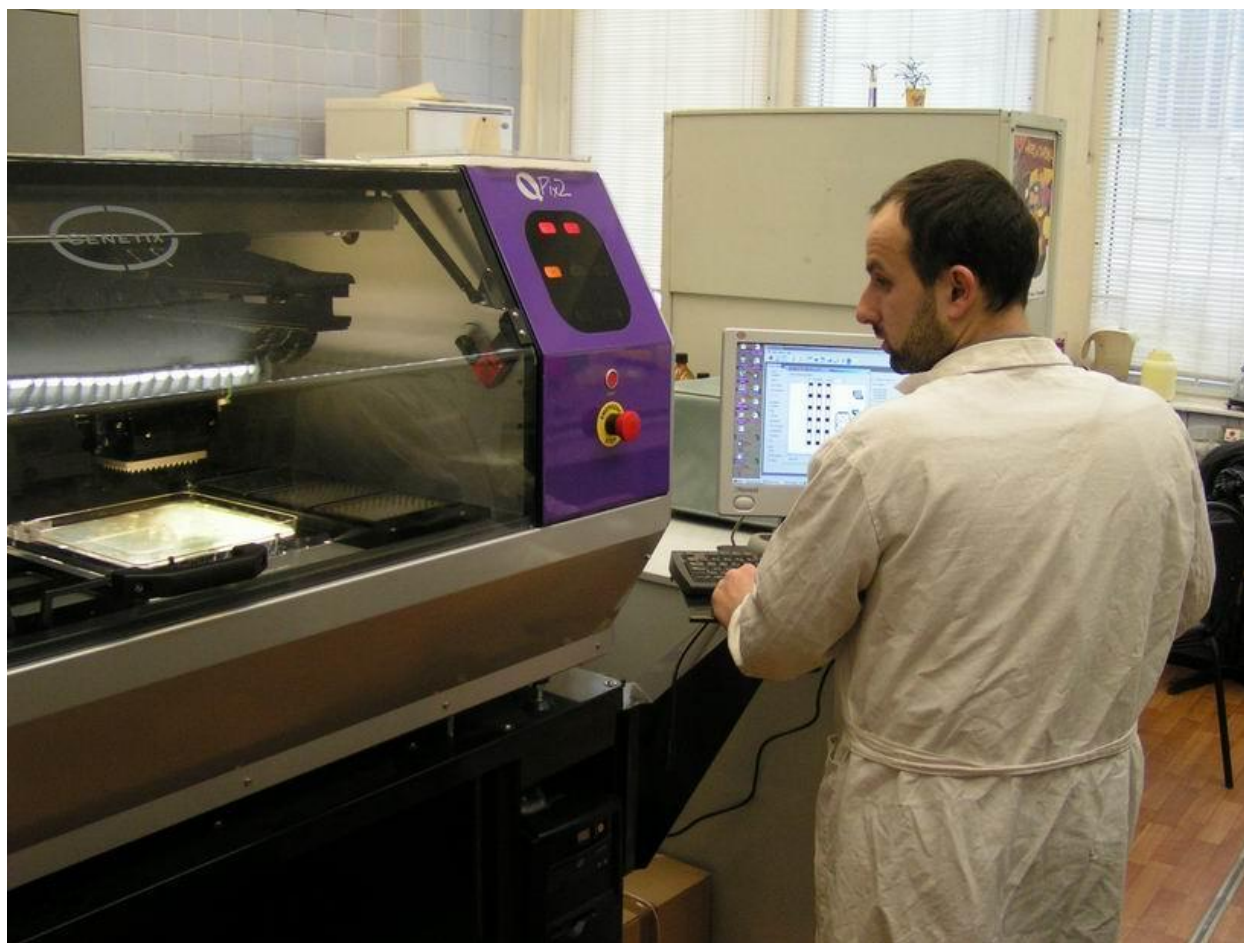


1 год; 24 тысячи тестов

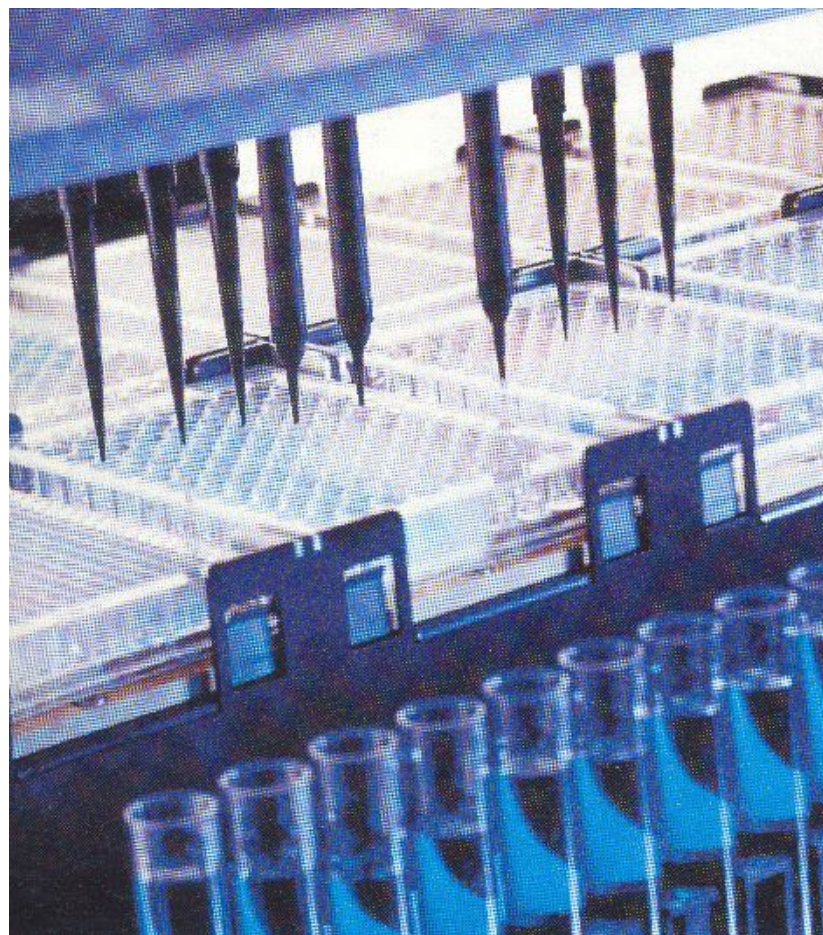
✓ **Результат: GS1: $8,1 \pm 1,2$ г/л**

Nature (2002) 415, 644-646

Робот для селекции микроорганизмов в ГосНИИгенетика



Робот для селекции микроорганизмов в ГосНИИгенетика



Условия применимости метаболической инженерии



**Знание цели, т.е. какой ген(ы) надо ввести
в организм, или какой ген надо инактивировать,
изменить регуляцию и т.д.**



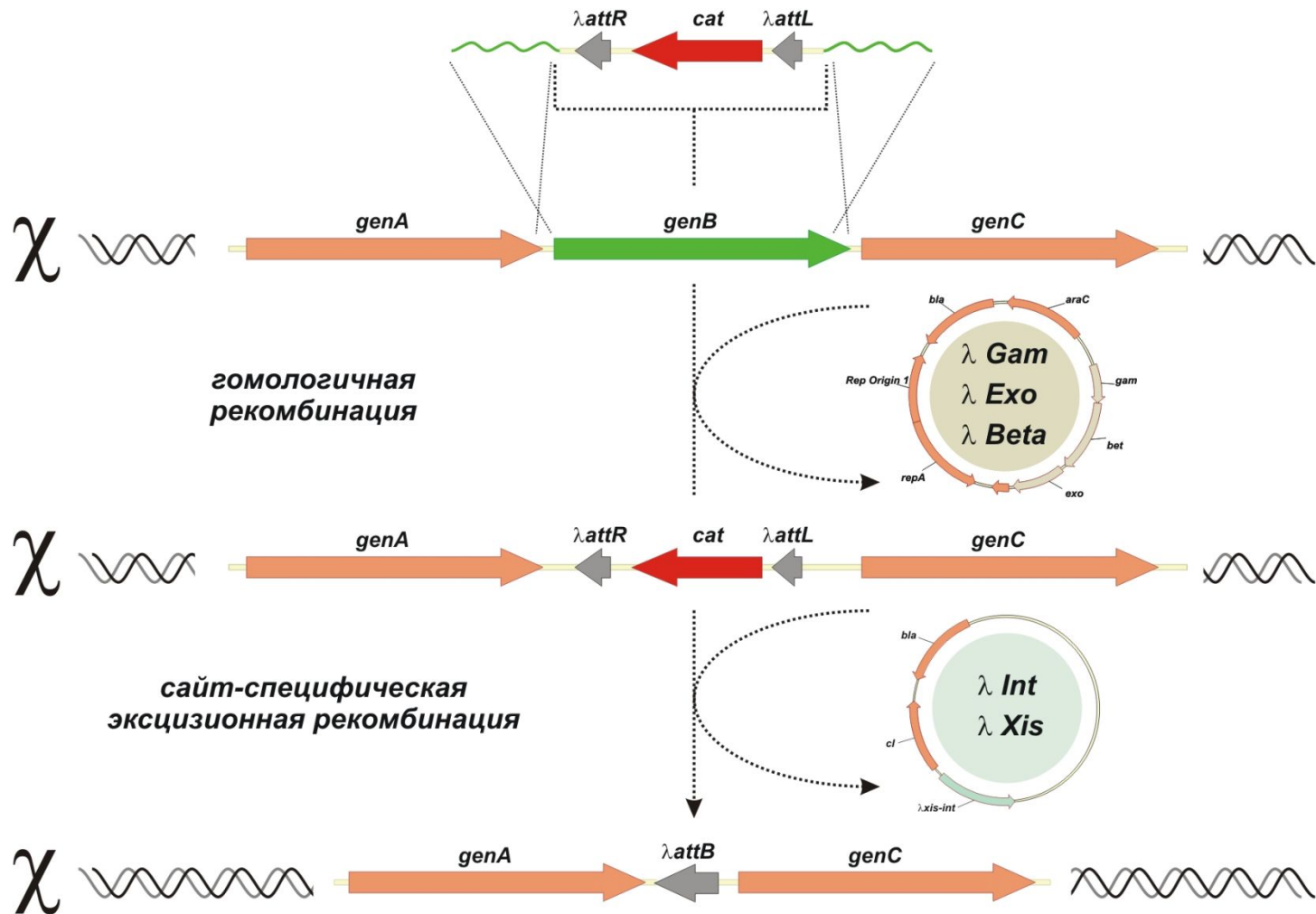
**Обладание способами генетического обмена
и конструирования**



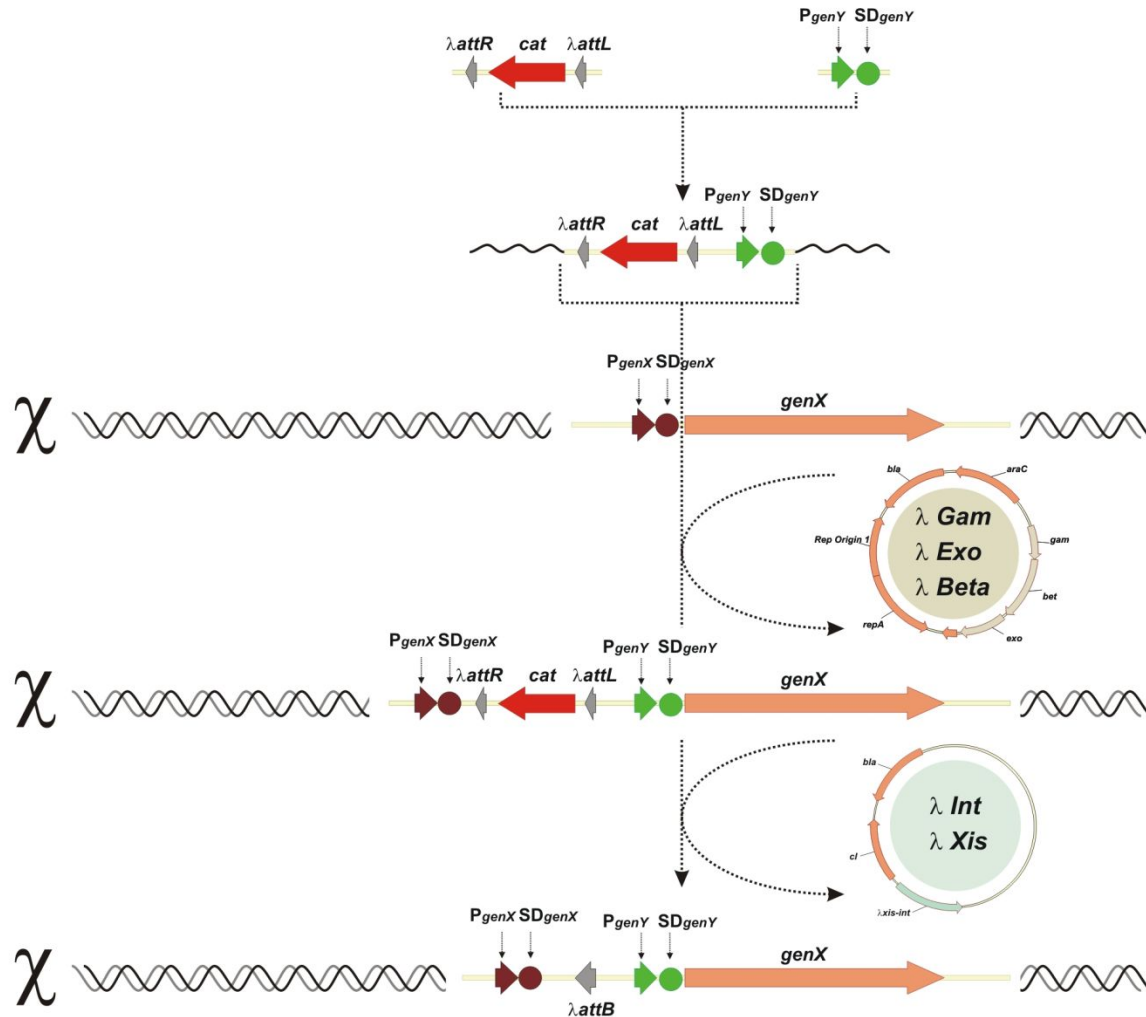
Владение методами оценки результатов

**генетических изменений на фенотипическом
уровне**

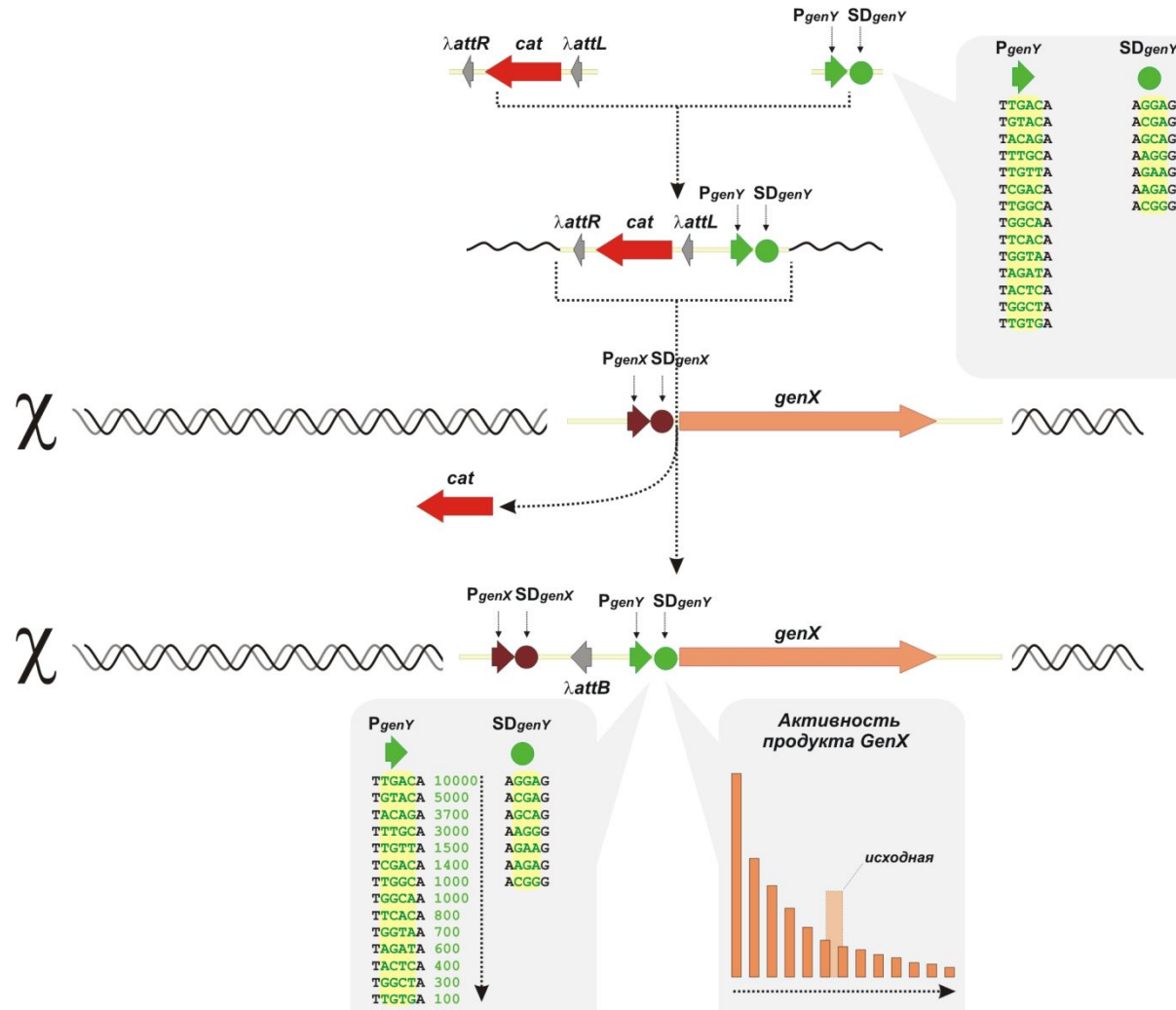
Инструментарий метаболической инженерии: Рекомбинационная инженерия. Делеция гена



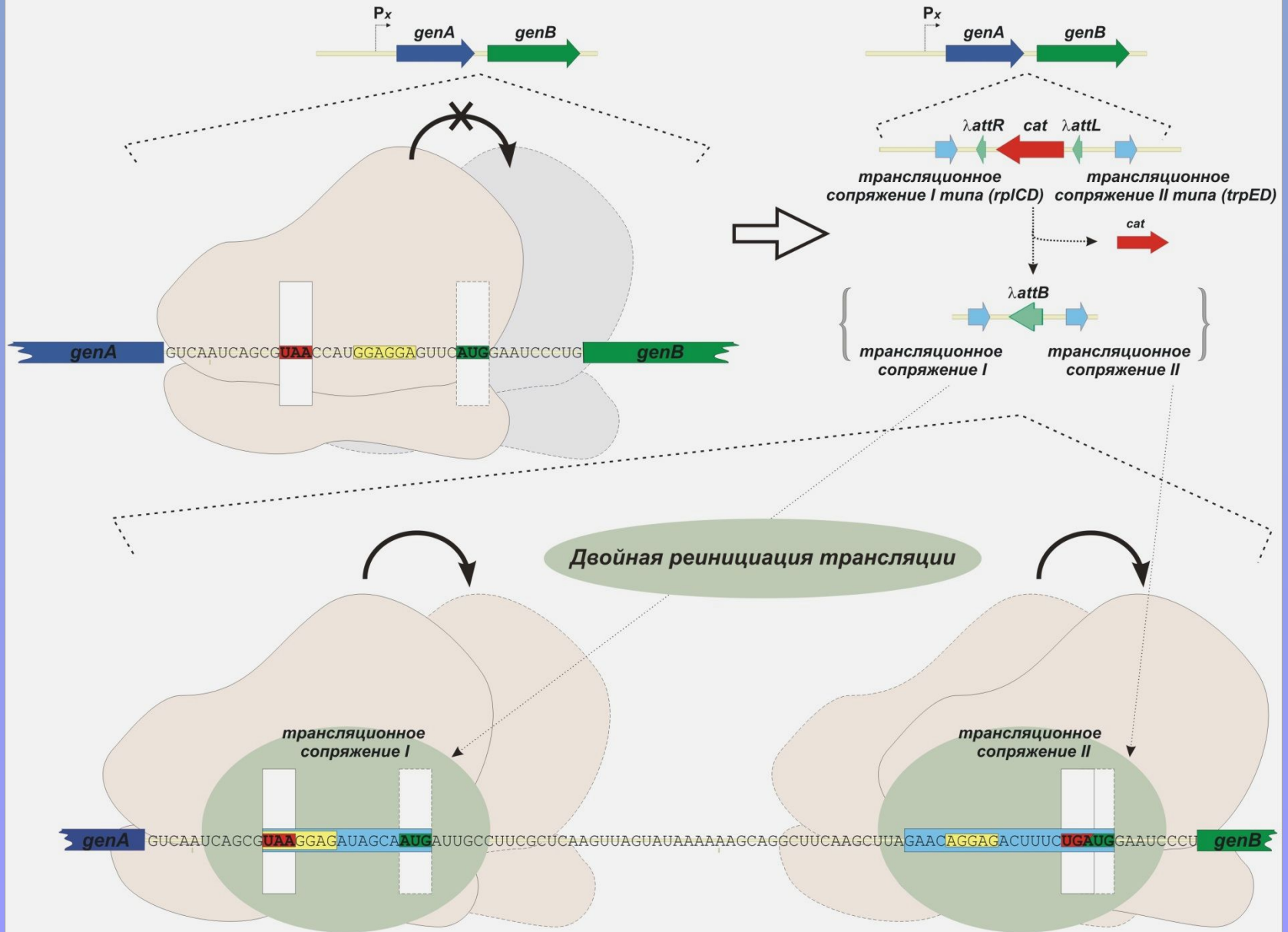
Инструментарий метаболической инженерии : Рекомбинационная инженерия. Оптимизация экспрессии



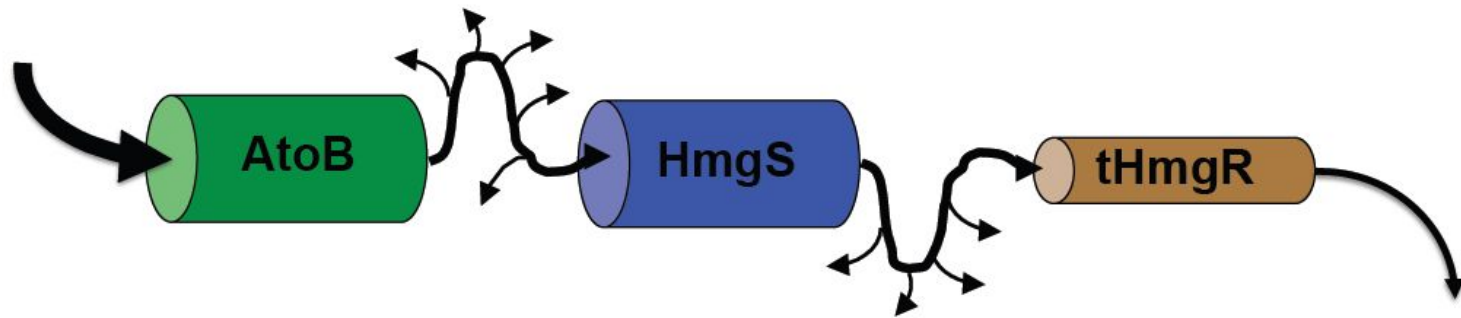
Инструментарий метаболической инженерии : Оптимизация экспрессии. Библиотеки промоторов и RBS



Оптимизация структуры искусственных оперонов. Обеспечение реинициации трансляции

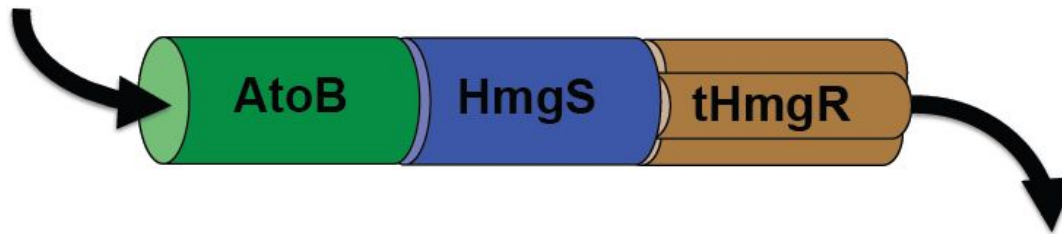


Synthetic scaffolds: another way to solve the problem



- Loss of intermediates to bulk solution
- Enzymes freely diffuse in the cell
- Especially problematic for cytotoxic intermediates

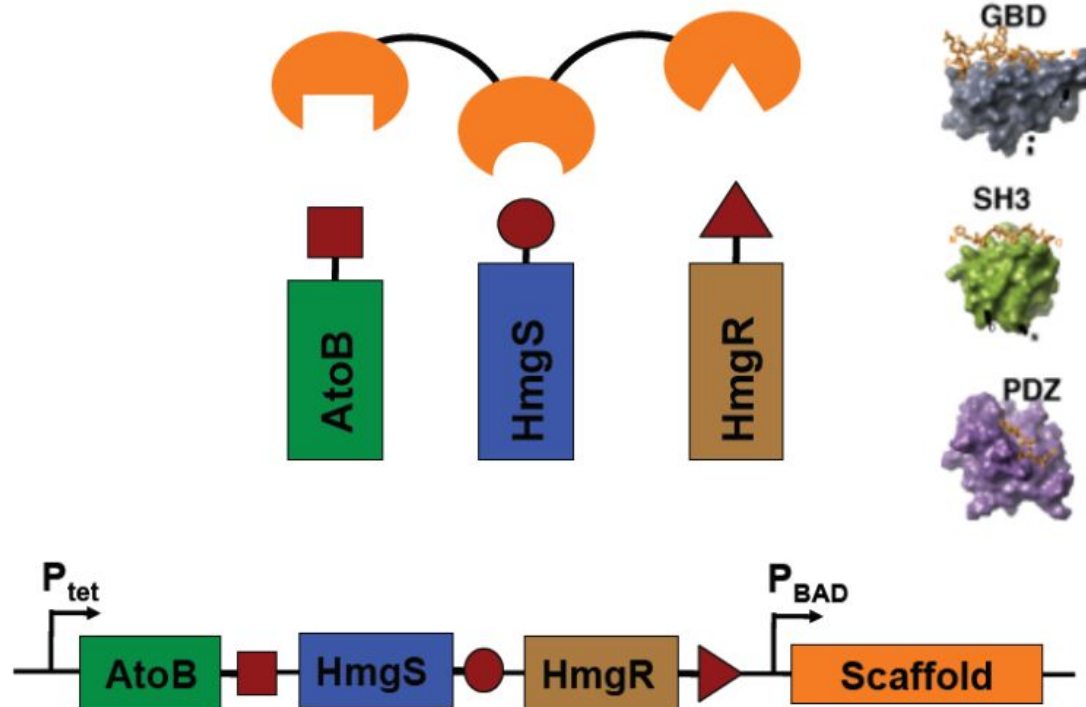
Connecting metabolic pipes with synthetic scaffolds



- Connecting the enzymes in some way might reduce loss of intermediate to the bulk
- Adding additional copies of rate-limiting enzymes might increase pathway flux



Synthetic scaffolds co-localize pathway enzymes and reduce intermediate runoff



Циклы метаболической инженерии



Гены из природных биотопов



Коллекция образцов
из окружающей среды
«Биотопы»



Изоляция ДНК
Environmental – DNA e



Клонирование
в хорошо изученный вид
микроорганизмов (Библиотека
генов - Environmental libraries)



Переклонирование
в разные виды для
оптимизации экспрессии
(*E. coli*, *S. lividans*, *P. putida*)

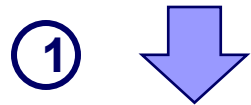


Скрининг активностей

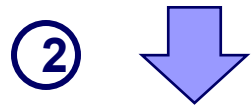


Биосинтез гидрокортизона в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*

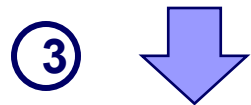
Глюкоза



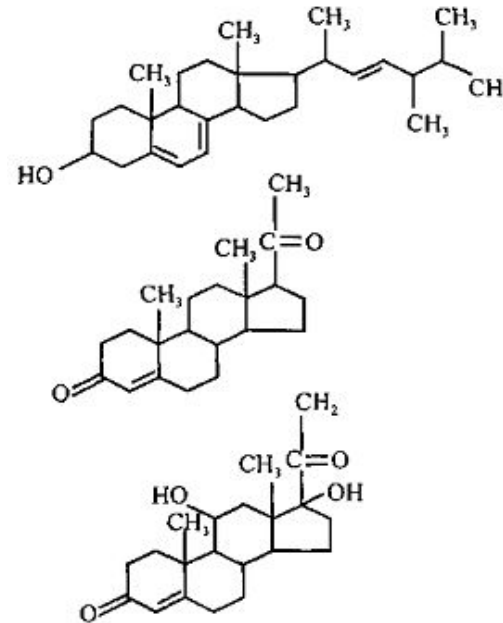
Эргостерин



Прогестерон



Гидрокортизон



1. Оптимизация синтеза эргостерина в дрожжах;
2. Трансформация в прогестерон
(введение двух генов растений и двух генов животных);
3. Превращение прогестерона в гидрокортизон
(введение двух генов человека и четырех генов быка).

**В ГосНИИгенетика созданы
лучшие в Мире
биотехнологии получения**



L - Треонина



Рибофлавина

Эти биотехнологии используются
ведущими биотехнологическими фирмами Мира.

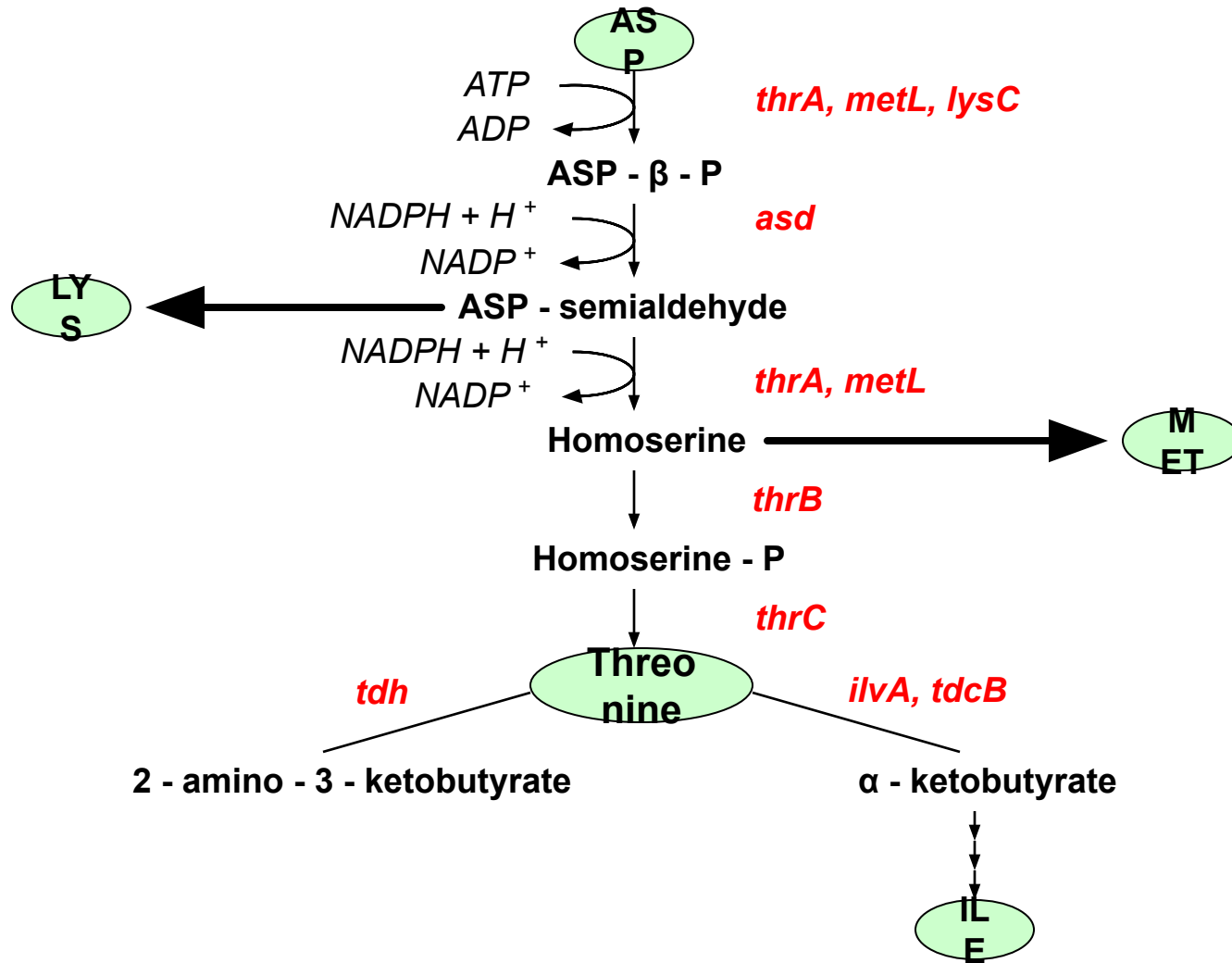


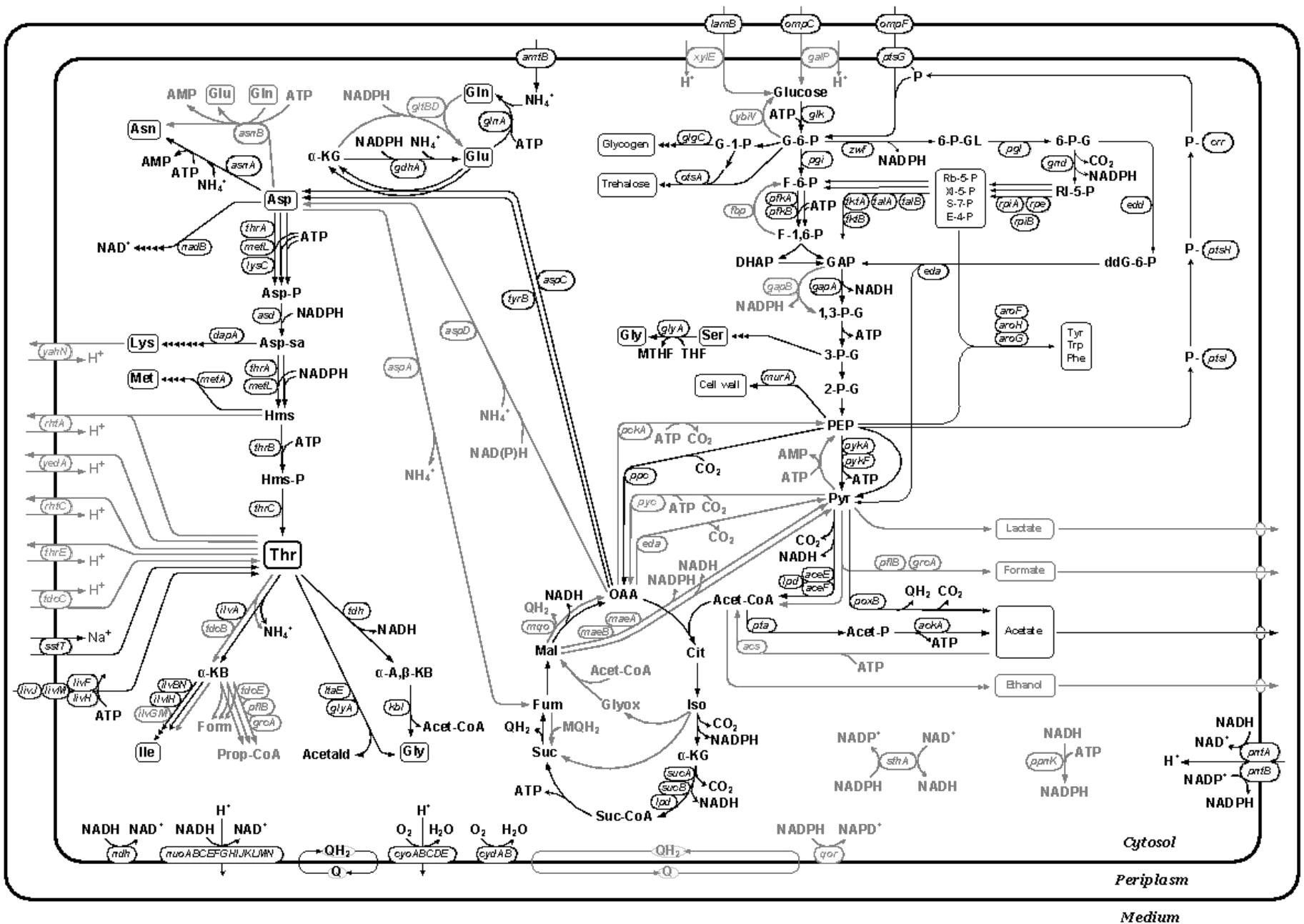
Аспарагида

Подходы: продуценты метаболитов

- 1. Выбор штамма и метаболического пути синтеза;**
- 2. Оптимизация транспорта субстрата в клетку;**
- 3. Оптимизация метаболического пути и синтеза необходимых кофакторов;**
- 4. Блокирование боковых путей;**
- 5. Оптимизация транспорта метаболита из клетки;**
- 6. Инактивация транспорта метаболита в клетку;**
- 7. Оптимизация свойств ключевых ферментов;**
- 8. Тонкая настройка экспрессии ключевых генов;**
- 9. Оптимизация продукции в ферментере.**

Биосинтез аминокислот аспарагинового семейства



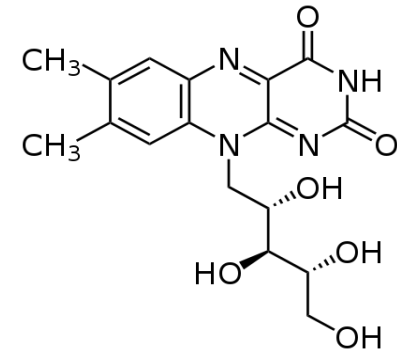


Cytosol
 Periplasm
 Medium

Рибофлавин (витамин В₂)

Общая характеристика и рынок

1. Мировое производство В₂ составляет около 5000 тонн.
2. Цена 1 кг продукта (в кристаллической форме) составляет 37 - 40 \$.
3. В РФ производства нет. Годовая потребность составляет приблизительно 300 тонн / год.



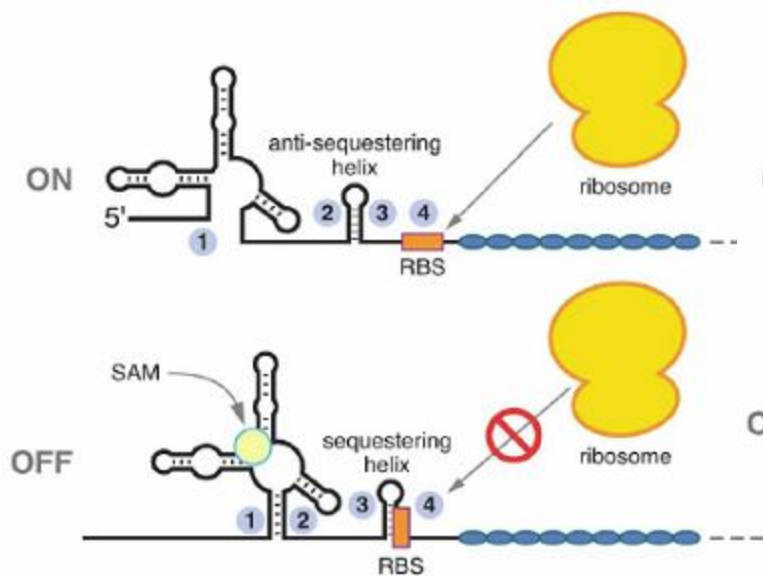
ГосНИИгенетика обладает высокопродуктивными штаммами бактерий мирового уровня.

Институт в 2007 году вывел эту технологию на мировой рынок.

К настоящему моменту готова **ещё более эффективная** технология

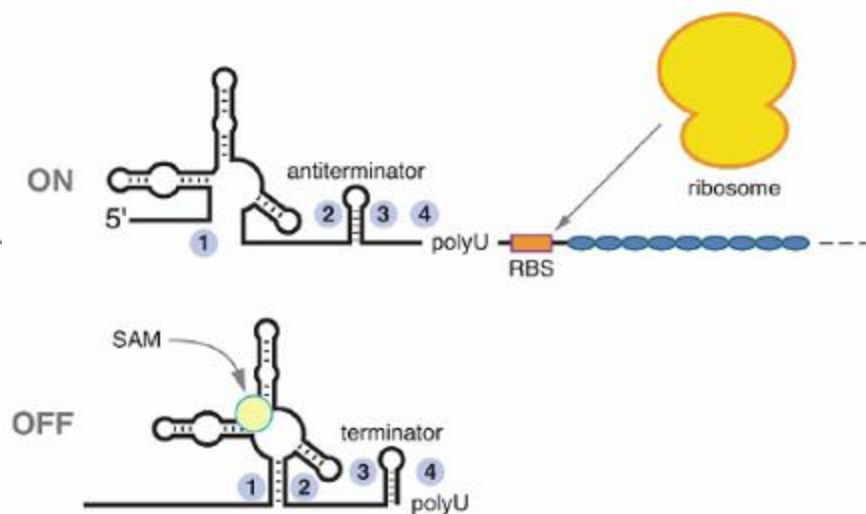
Модель рибосвитч - механизма регуляции экспрессии генов на уровне транскрипции (a) и трансляции (b)

(a)



регуляция экспрессии генов на уровне транскрипции

(b)



регуляция экспрессии генов на уровне трансляции

Биокаталитическое получение акриловых мономеров

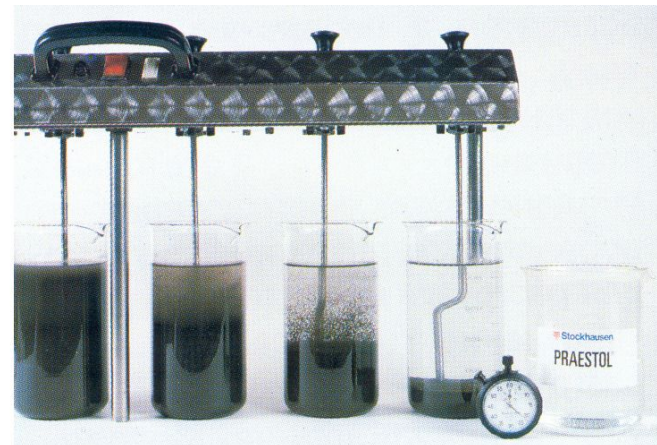
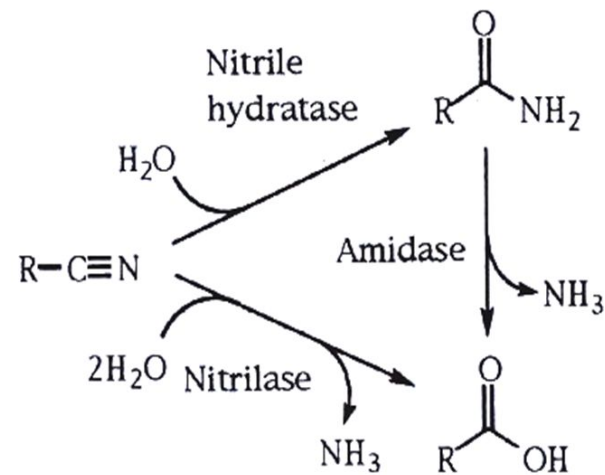
Энзиматическая конверсия нитрилов и амидов

Акриловые мономеры

- Акриламид
- Акриловая кислота
- N-замещённые акриламиды

Полиакриламид

Флокулянты



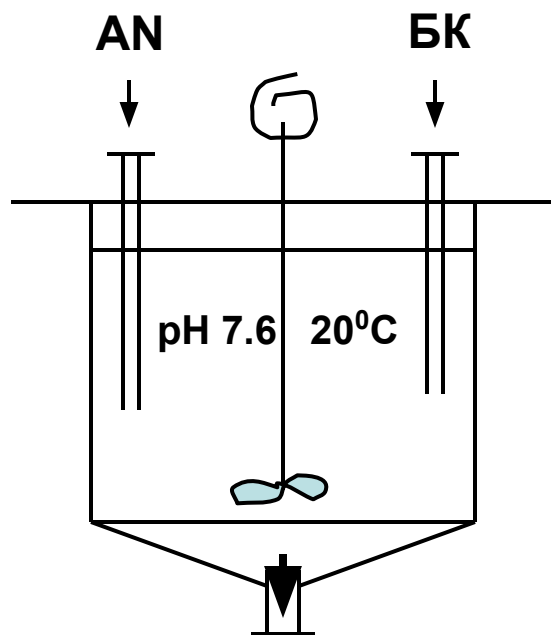
Российское предприятие по производству флокулянтов на основе биоакриламида, г. Пермь



Флокуляция

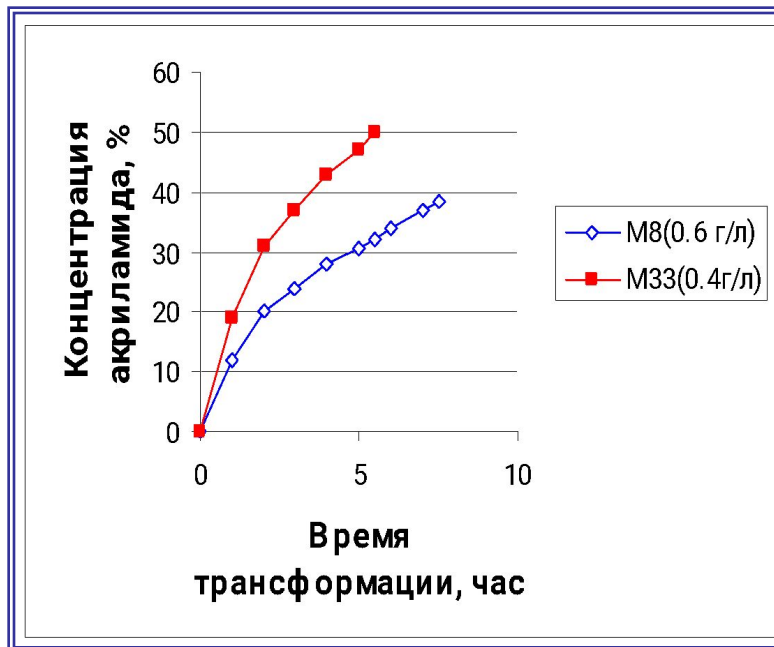


Биотрансформация акрилонитрила в акриламид с помощью БК-М33



Продуктивность БК >1000 г АА / г БК

Стоимость БК – около 5 % от стоимости АА



Патент US 5827699

“Strain of *Rhodococcus rhodochrous*
as a producer of nitrile hydratase”

Цели селекции микроорганизмов

1. Повышение выхода (г/г) и скорости (г/л/час) биосинтеза;
2. Снижение биосинтеза побочных продуктов;
3. Улучшение технологических параметров (скорость, устойчивость к стрессам, морфология колоний для актиномицетов и нитчатых);
4. Улучшение питательных потребностей (рост на дешевых субстратах: глюкозе, ксилозе, арабинозе);
5. Производство гетерологичных белков для медицины и биокатализа;
6. Введение новых путей биосинтеза (деградация ксенобиотиков, синтез новых метаболитов);

Новые цели XXI века :

- биоматериалы для нанотехнологий и биоэлектроники (специальные пептиды; родопсин и т.д.);
- конструктивные материалы для медицины и техники (белки паутины, коллаген);
- микрогранулы для топливных элементов и т. д.

Спасибо за внимание!