

Микробы для фабрики

С заместителем директора ГНЦ ГосНИИгенетика, доктором биологических наук **А.С.Яненко**, беседует наш корреспондент **М.Литвинов**.

Получать вещества с помощью микроорганизмов зачастую выгоднее, чем химическим синтезом, и почти всегда это более безопасно для персонала и окружающей среды. Кроме того, микроорганизмы могут производить оптические изомеры веществ, что очень важно при синтезе лекарств.

Хотя микробы уже тысячи лет используются человеком, их промышленный потенциал еще далеко не исчерпан. Однако если в 80-е годы основные средства вкладывали в медицинские приложения — в производство антибиотиков и витаминов, то сейчас (возможно, в связи с истощением ископаемых ресурсов) опять вырос интерес к промышленной микробиологии, к изготовлению ферментов, материалов и топлива. В США, например, принята программа «Биомасса» (о ней в четвертом номере нашего журнала за 2005 год рассказывал директор ГНЦ ГосНИИгенетика, член-корреспондент РАН В.Г.Дебабов — *Примеч. Ред.*). Евросоюз в следующем году тоже готовится подписать подобную программу под названием «Белая биотехнология».

Давайте поговорим о проектах, цель которых — получение низкомолекулярных веществ. Некоторые из них, например молочную кислоту, производят известные микроорганизмы, и главная задача биотехнологов — улучшить свойства готового штамма. А как можно производить вещества, для которых продуцентов еще нет?

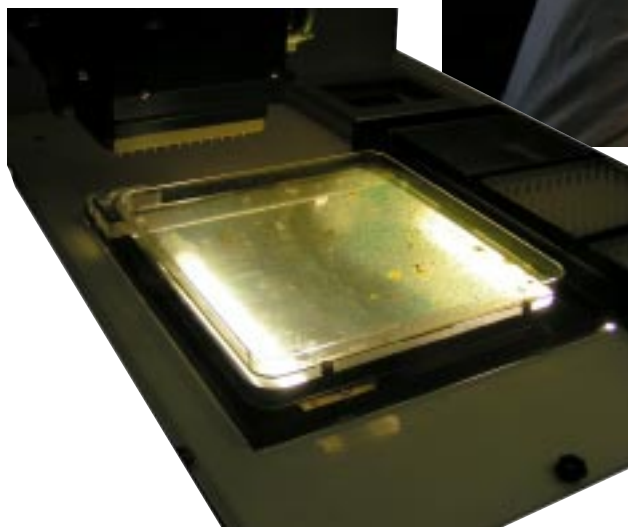
Первое, что можно попытаться сделать, — это найти подходящие микроорганизмы в природе, в том числе и в экзотических местах: в содовых озерах, во льду, в термоисточниках, дренажных водах на шахтах и т. д. Это неисчерпаемый источник для поиска новых микробов и ферментов. По современным оценкам, мы знаем всего 5% обитающих на Земле микроорганизмов.

Проблема состоит вот в чем. Если классический микробиолог говорит: «Мы знаем этот микроорганизм», это значит, что он может культивировать его в лаборатории, на определенных

ГосНИИгенетика — ведущий российский институт в области генетики, селекции и геной инженерии промышленных микроорганизмов.

При селекции микроорганизмы высевают в чашку Петри, на агар с антибиотиком. Выжить на нем могут только клетки, обладающие геном устойчивости к этому антибиотику. А с этим геном специально сцеплены целевые гены, от которых зависят полезные технологические свойства штамма. Сотрудник ГосНИИгенетика К.Лавров оценивает количество выросших колоний. Затем их можно отобрать для дальнейших исследований

Специальная чашка Петри с агаром, на котором выросли колонии бактерий



Пластины с лунками для одновременного выращивания и анализа 384 клонов бактерий





Прибор запоминает положение колоний и переносит их в лунки планшета для дальнейшего изучения. Другой прибор добавляет к бактериям субстрат, чтобы узнать по появлению окраски, способны ли они его переработать



ПРОБЛЕМЫ И МЕТОДЫ НАУКИ

питательных средах. Однако не всякий организм удастся выращивать в искусственных условиях. Иногда ученый точно знает, что во взятом образце почвы или воды есть какая-то жизнь, видит в микроскоп клетки, изменение их количества; определяет, что идут какие-то превращения веществ, но не может выделить микроорганизмы и культивировать их. И тогда он говорит, что не знает, какие там микробы. А ведь именно они могут содержать нужные нам ферменты и выполнять требуемые превращения.

Штамм «диких» бактерий, способных осуществлять нужную нам реакцию, скорее всего, не подойдет для промышленного производства, поскольку эффективность его работы окажется слишком низкой и получать вещества с его помощью будет непродуктивно и дорого. Раньше, с конца XIX века, штаммы микроорганизмов улучшали и приспосабливали для промышленного культивирования с помощью селекции, в 1950-е годы к ней добавился искусственный мутагенез.

Эти методы отчасти используют и сейчас. Кроме того, в 70-е годы минувшего столетия активно развивалась молекулярная генетика и анализ структуры ДНК; изучали, как регулируется работа генов. Когда с этим разобрались, стало возможно осмысленно вносить мутации, менять регуляцию и т.д. Например, если фермент работает индуцибельно, то есть только при появлении в среде своего субстрата, мы можем заставить его работать конститутивно — постоянно, на высоком уровне. А если продукт оказывает репрессирующее действие на

синтез, можно это отменить.

За последние десятилетия мы ушли еще дальше. Современный микробиолог может не искать готовый микроорганизм или немного изменять отобранный, а сотворить нужный продуцент. Допустим, требуется произвести 3-гидроксипропионовую кислоту, которую никакой известный микроорганизм не синтезирует. И вы начинаете думать, как же ее получить: из каких веществ, через какие стадии, с помощью каких ферментов. Конечно, по аналогии с уже известными метаболическими путями. Например, гидроксигруппу можно получить восстановлением альдегидной группы, а карбоксильную — окислением альдегидной группы или карбоксилированием (присоединением $-\text{COOH}$).

Раньше ученый сказал бы: «Давайте искать микроорганизм, способный выполнить эти превращения. Будем проверять сотни, тысячи, среди них может оказаться то, что нам надо». Это очень трудоемко и неудобно. А сейчас мы можем попытаться сделать такой штамм. Для этого отбирают, или, иначе говоря, рекрутируют нужные гены из разных организмов и разных метаболических путей, лишь бы ферменты — продукты этих генов — проводили запланированную реакцию. Рекрутируют гены не одного, а нескольких смежных ферментов, составляющих новый метаболический путь. Он может состоять, к примеру, из пяти-шести стадий. Гены выстраивают рядом, ставят под контроль регулирующего элемента и таким образом собирают ансамбль — искусственный оперон, так что все эти гены работают вместе. Так и в клетке: если



Проверить, как растет новый штамм, узнать его свойства, а затем нарастить биомассу можно в лабораторном ферментере



Высокоэффективный жидкостный хроматограф необходим, чтобы определить химический состав культуральной жидкости. В ней могут содержаться те самые вещества, которые мы собираемся производить

она превращает одно за другим несколько веществ, то гены, контролирующие эти превращения, организованы в единый ансамбль и расположены рядом, сцеплены.

Вообще, создание новых метаболических путей — это необычная процедура. Само это направление, метаболическая инженерия, начало развиваться совсем недавно, и результатов пока немного. Я знаю только несколько примеров. Один, когда подобным образом сделали штамм для получения 1,3-пропандиола. Такой же подход сейчас пробуют применить, чтобы создать продуцент 3-оксипропионовой кислоты: в микробных клетках она не образуется, но можно собрать гены из разных организмов и сконструировать новый микроорганизм, производящий ее. Об этой работе недавно объявили и даже получили патенты. Конечно, выходы пока низкие, но начало положено.

Как сейчас ищут гены для подобных манипуляций? В догеномную эру приходилось искать микроорганизм с нужной нам активностью, затем клонировать его ДНК, разыскивать гены, отвечающие за определенные функции. Это было очень долгое и трудное дело.

Сейчас все стало намного проще. Наколпена огромное количество данных по геномам и отдельным генам бактерий, грибов, растений, животных. Нуклеотидные последовательности генов и геномов включены в ком-



Центрифуга нужна, чтобы осадить клетки бактерий

пьютерные базы, где можно найти много полезного. Поиск происходит таким образом. Как правило, у ферментов, катализирующих одну и ту же реакцию (скажем, восстановление альдегидной группы до спиртовой), есть фрагменты с близкой последовательностью аминокислот, а у их генов — с похожей последовательностью нуклеотидов. Зная ее для одного фермента, с помощью специальных математических алгоритмов можно найти в базах данных подобные последовательности для других генов (их называют гомологичными). Это и есть кандидаты на создание искусственного оперона. Их может оказаться несколько десятков. Дальше уже проще. Зная последовательность нуклеотидов выбранного нами гена, можно синтезировать праймер — «затравку» — и наработать в ПЦР, полимеразной цепной реакции, много копий этого гена, затем объединить его с другими генами и посредством век-

тора (специальной последовательности нуклеотидов) вставить в геном бактерии.

Если же у известных организмов не удалось найти подходящие гены, можно попытаться отыскать их прямо в природе. Для этого в последние годы разработаны методы выделения и анализа суммарной (тотальной) ДНК из почвы или воды какого-нибудь местообитания.

В массе выделенной и секвенированной ДНК можно поискать гены, гомологичные тем, что нам нужны. Может оказаться, что фермент, необходимый для синтеза, например, 3-оксипропионовой кислоты, есть в какой-то морской бактерии.

Кстати, необязательно, чтобы фермент был «от природы» рассчитан для задуманного нами превращения. Ферменты, конечно, специфичны, то есть приспособлены для превращения ограниченного набора молекул, чаще всего — только одного типа. Однако иногда они могут использовать синтетические субстраты. Никто не знает наперед, может ли фермент превращать

Самый известный проект по получению ДНК из природных местообитаний — это выделение суммарной ДНК из воды Саргассова моря. Несколько лет назад эту операцию провели специалисты компании «Celera» под руководством Крейга Вентора. Авторы секвенировали 1 млрд. 45 млн. нуклеотидных пар. С помощью специального алгоритма установили, что в образце содержится 1800 видов геномов, включая 148 до сих пор неизвестных бактериальных фило-типов (типов организации генома, характерных для определенных таксономических групп бактерий). Эта работа увеличила количество известных генов и белков бактерий почти в десять раз. До этого в самой известной базе белковых последовательностей «SwissProt» содержалась информация о 137885 белковых последовательностях микроорганизмов. Исследователи бактерий Саргассова моря добавили в нее 1214207 новых последовательностей.

то или иное вещество, и узнать это можно только в опыте: взять микроорганизм, дать ему субстрат и посмотреть, происходит ли превращение субстрата в продукт или нет.

Гомологичные ферменты из разных источников сходны по основной функции, но отличаются по специфичности, особенно по отношению к синтетическим субстратам. Вы даете ему искусственный субстрат, с которым клетка никогда не сталкивалась ранее, и в некоторых случаях удастся обра-ботать фермент с новой активностью. После того как мы найдем ген такого фермента, мы можем вставить его в кишечную палочку или любой другой микроорганизм, годный для промышленного культивирования. В общем, ситуация совершенно изменилась.

Можно привести такой пример поиска генов в природе. До недавнего времени было известно всего шесть генов нитриаз — ферментов, гидролизующих нитрильные группы. Специалисты фирмы «Diversa» собрали образцы почвы из десятков мест. С помощью амплификации (ПЦР) выделили 140 генов, выполняющих ту же функцию. Их объединили в шесть семейств. Таким образом, получили

огромный набор генов, в чем-то сходных, но различающихся по субстратной специфичности, активности и т. д. На этой базе уже можно выяснять, например, какие аминокислоты необходимы для выполнения функции, а какие менее важны. А понимая связь структуры с функцией, логично перейти к следующему этапу — рациональному дизайну фермента, замене аминокислот в нем, чтобы он лучше работал — был устойчив к определенным внешним воздействиям, был достаточно активным. Для этого не берут готовый ген, контролирующей образование фермента, а изменяют его.

Для рационального дизайна нужно точно знать, как работает фермент, как устроен его активный центр, как происходит акт катализа. Тогда можно заменить определенные аминокислоты, и фермент начнет работать по-другому, если повезет — лучше прежнего. Однако нет никакой гарантии, что все получится, как задумано.

И вот лет десять назад возникло направление, которое называется искусственной эволюцией. Ген насыщают мутациями в пробирке. Для этого его много раз копируют — проводят реакцию полимеризации в таких ус-

ловиях, при которых исходная ДНК копируется неточно, с большим количеством ошибок. Получается библиотека молекул ДНК с различными вариантами исходной последовательности. Потом берут много бактерий, и полученные молекулы вводят в эти клетки (такая манипуляция называется трансформацией). При этом в каждую клетку попадает только одна молекула ДНК, и в десятках тысяч клеток содержится столько же вариантов гена. Задача — выбрать из них тот, который нам подойдет.

Здесь без робототехники не обойтись, уж очень много времени нужно затратить на поиски удачных штаммов. Человек в день может проанализировать две-три сотни клеток. Он должен взять колонию, поместить ее в небольшой объем культуральной среды, добавить субстрат и определить активность. Если процедура сложная, за день получится несколько десятков определений. Этого мало. Как только появились методы эволюции, появилась потребность в робототехнике. Робот делает намного больше: сотни и тысячи определений в сутки.

Эти обстоятельства совершенно изменили парадигму получения нужных микроорганизмов. Раньше искали штамм, способный стать продуцентом требуемого вещества, затем его долго улучшали. Сегодня сначала предъявляют к этому штамму перечень необходимых требований, а потом подгоняют его под идеал.

Что еще можно прочитать о методах получения штаммов микроорганизмов

Дебабов В.Г. Селекция микроорганизмов на заре XXI века. Биотехнология, 2005, № 4.

Секвенатор читает последовательность нуклеотидов в ДНК



Автор благодарит К.Лаврова за помощь в подготовке иллюстраций