

ВВЕДЕНИЕ В ИНФОРМАЦИОННУЮ БИОЛОГИЮ

Н.А. Колчанов, С.А. Лашин

Электронно-лекционный курс
разработан в рамках реализации Программы развития НИУ-НГУ
2012 год

Лекция 4
***Современные подходы в создании
промышленных биотехнологий***

Сферы применения классической промышленной биотехнологии

- **Биоэнергетика и биотоплива**
- **Переработка биомассы**
- **Пищевая промышленность**
- **Агротехнологии**
- **Биоремедиация**
- **Косметика**
- **Биоматериалы: биопластики, биопленки.**
- **Целлюлозно-бумажная промышленность**
- **Текстильная промышленность**
- **ПАВ**
- **Промышленные ферменты**
- **Биобезопасность**
- **Автопромышленность**

Продукты, используемые в повседневной жизни, получаемые посредством промышленной биотехнологии

Протеазы – стиральные порошки

Целлюлазы – производство биоэтанола

Интермедиаты для фармсинтеза и химсинтеза

ГФС (глюкозо-фруктозные сиропы)

Полилактиды

Обработка волокон в текстильной промышленности

Аскорбиновая кислота

Промышленные жиры





Химические компании
DuPont, DOW, DSM, BASF

Поставщики возобновляемого сырья
Cargill, Ceres

Разработчики технологий
**Novozymes, Genencor,
Codexis**

Производители биотоплив
**Abengoa Bioenergy, Iogen, BP,
Chevron**

Производители биопластиков,
биоматериалов
NatureWorks, Metabolix

Примеры промышленного использования биотехнологий

- **BASF – разработка процессов производства хиральных интермедиатов химического синтеза**
- **Degussa – разработка биокатализаторов для химических процессов**
- **Boehringer – Ingelheim – инвестировала 260 млн \$ в разработку технологий культивирования клеток и ферментацию**

В настоящее время 5 % мирового производство химической продукции производится с применением биотехнологий

- Спирты, органические кислоты **этанол** 15 млрд \$
 лимонная кислота 2 млрд \$
- Аминокислоты **глутаминовая** – 1,5 млрд \$, **лизин** – 1 млрд \$
- Витамины **витамин С** – 1 млрд \$, **витамин В2** – 0,3 млрд \$
- Синтез фармсубстанций 7,5 млрд \$
- Промышленные ферменты 4 млрд \$

К 2030 г 35 % мирового производства химической продукции составит продукция биотехнологий

К 2050 г планируется полный переход на возобновляемые ресурсы

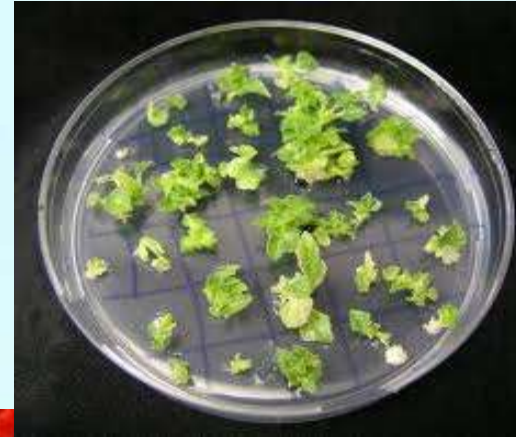
Основные направления «Третьей» волны биотехнологии

- Снижение нагрузки на окружающую среду (снижение выбросов CO₂)
- Развитие промышленных биотехнологий
- Переход химической промышленности на возобновляемые ресурсы
- Применение биотехнологии в химическом и фармацевтическом синтезе

Объекты промышленной биотехнологии

Генетически измененные бактерии, дрожжи, грибы, клетки животных, растения.

- Позволяют снизить затраты на производство
- Меньше загрязнять окружающую среду
- Эффективнее использовать ресурсы



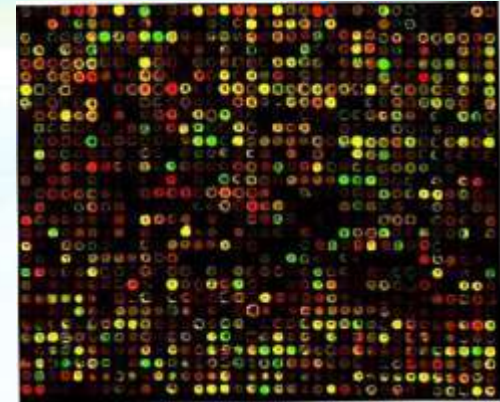
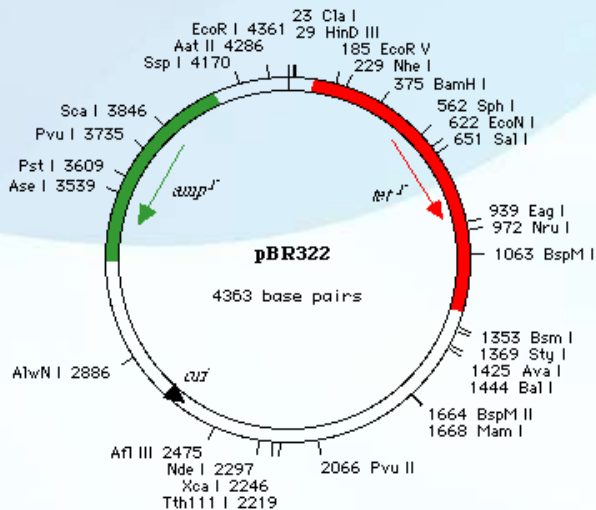
Исследование природного разнообразия экстремофильных и других групп микроорганизмов



Экстремофильные микроорганизмы обитают в условиях высоких (до 100 °С) или низких (до – 20 ° С) температур, высокой солености, давления и других условиях

Подходы, применяемые в создании промышленных штаммов микроорганизмов

- Генетическая инженерия (создание устойчивых молекулярных векторов для различных организмов)
- Мутагенез
- Исследование экспрессии генов с применением биочипов
- Создание стрессоустойчивых штаммов
- Масштабирование процессов ферментации
- Улучшение технологических параметров процессов



Биоинженерия микроорганизмов - стратегия

- Выбор продуцента
- Выделение (синтез) необходимой ДНК
- Создание вектора
- Трансформация клеток
- Селекция клеток, экспрессирующих целевой ген
- Выделение продукта

Методы, применяемые для создания современных промышленных биотехнологий

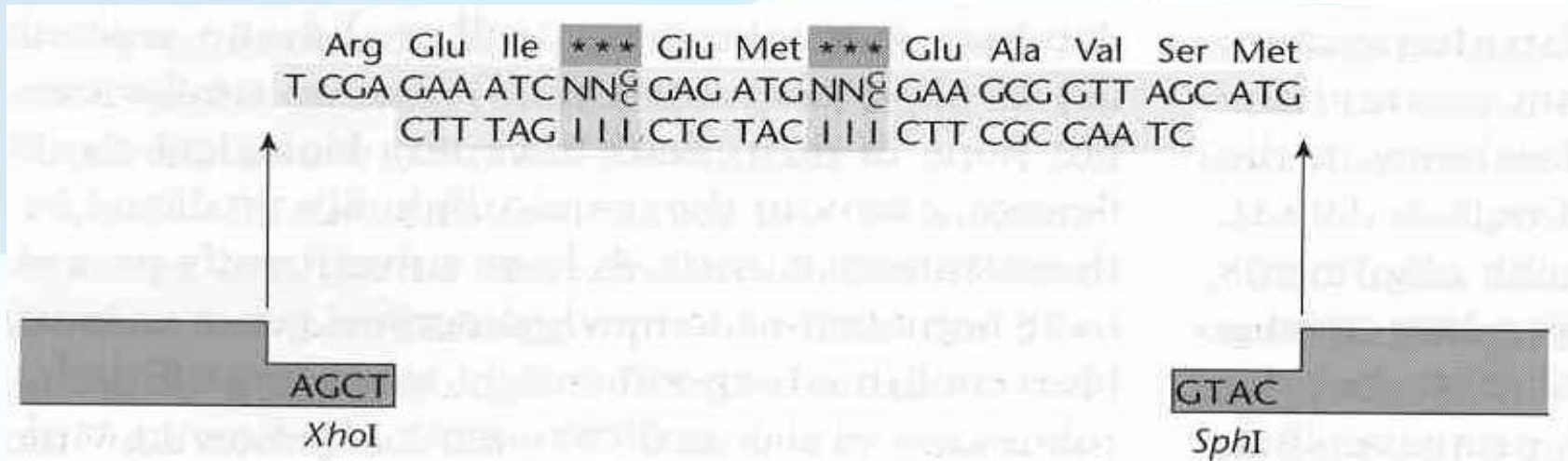
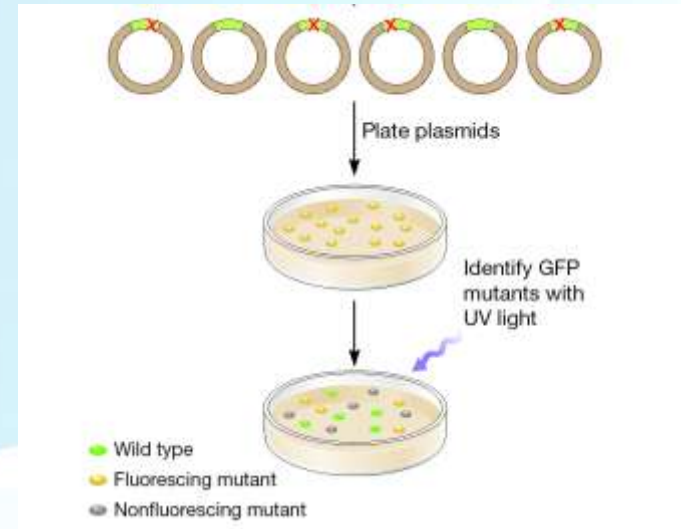
- HTS – технологии высокопроизводительного скрининга (High Throughput Screening)
- Мутагенез
- «Gene Shuffling» - «перетасовывание генов»
- Направленная эволюция
- Метаболическая инженерия
- Биоинженерия белков
- Биоинформатика

Методы внесения мутаций в гены

ПЦР пониженной точности
(error prone PCR)

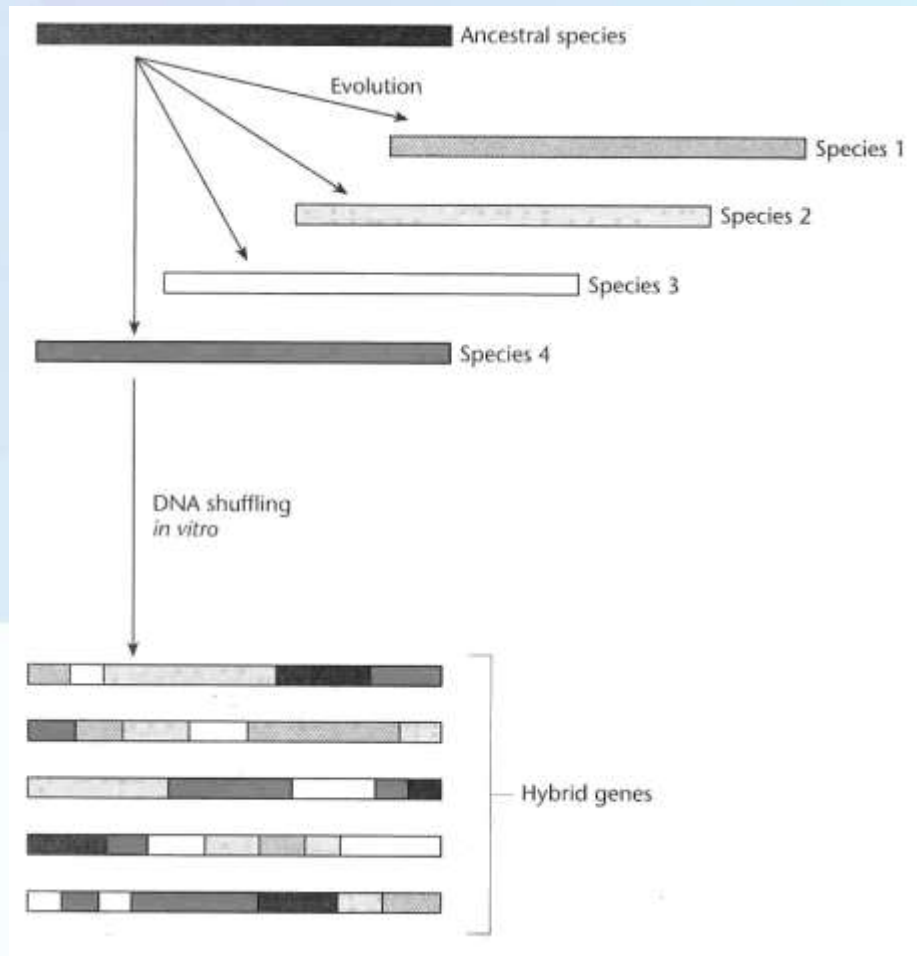
Сайт – направленный мутагенез

Кассетный мутагенез



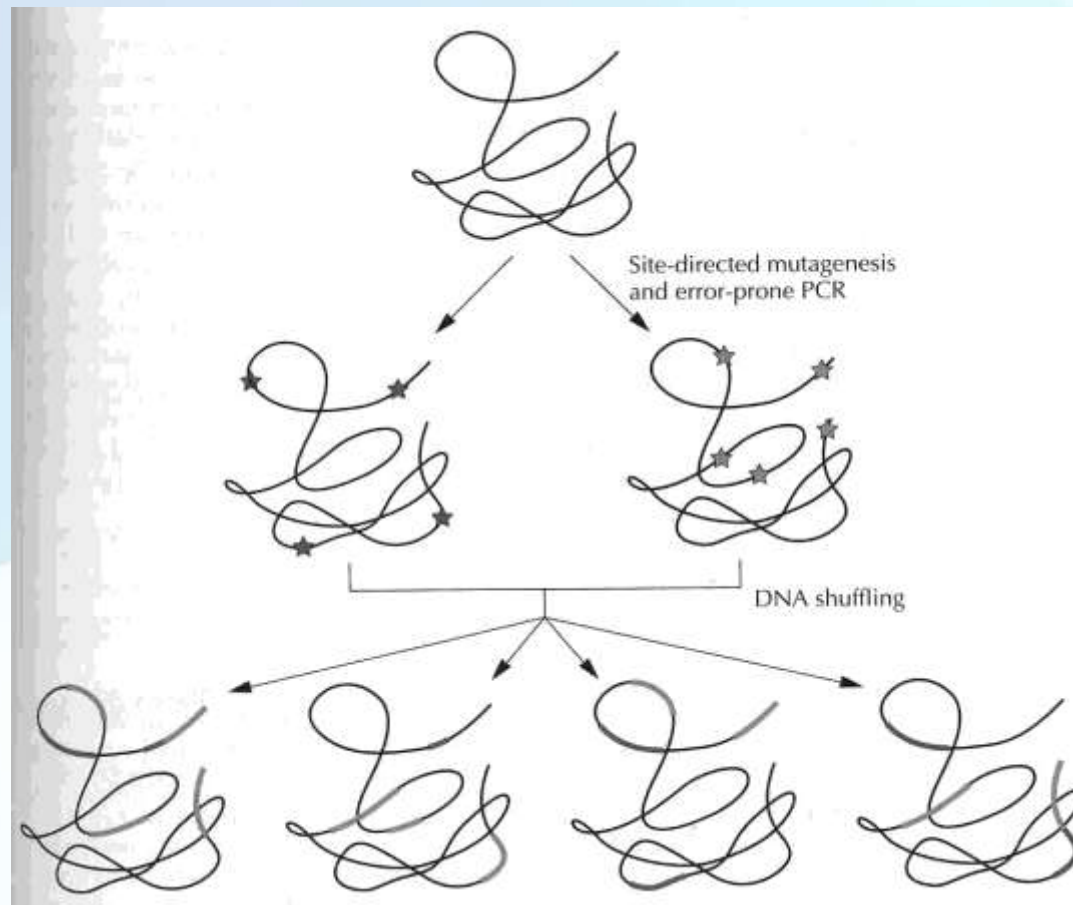
Обработка мутагенами (УФ, метилсульфонат и др.)

Метод «Gene Shuffling»



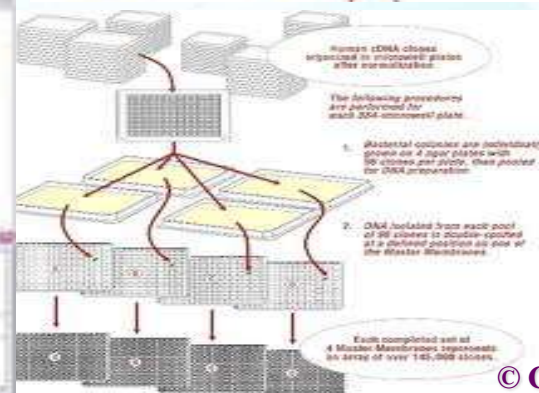
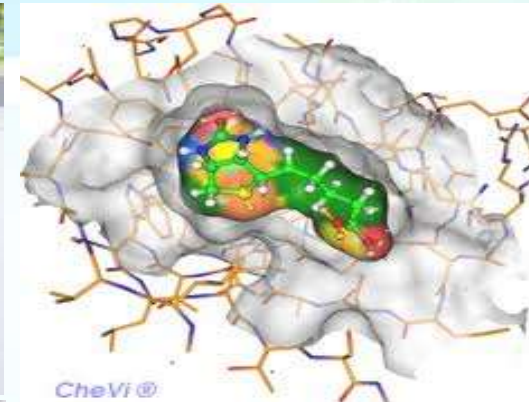
Создание множества последовательностей с «перетасованными» участками целевого гена

Создание промышленных ферментов «на заказ» - сочетание внесения точечных мутаций и «Gene shuffling»



High Throughput Screening (скрининг и отбор мутантов)

- Анализ клонов > 100000 шт
- Моделирование структуры белка и изучение связи структура- активность



Основные сферы применения биотехнологии в производстве

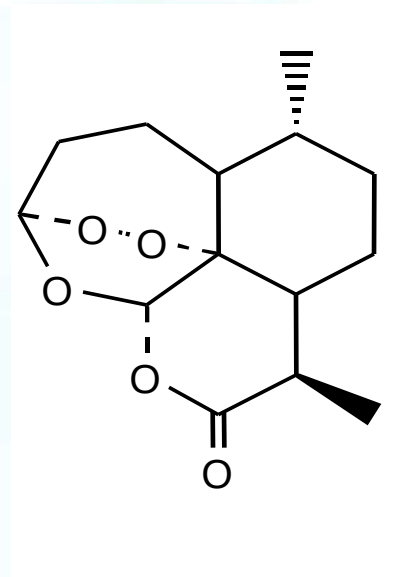
- Лекарственные препараты
- Химические вещества
- Биотопливо
- Производство ферментов

Разработка продуцента противомалярийного препарата в клетках *E. coli*.



Artemisia annua
(полынь однолетняя)

Артемизинин —
противомалярийный препарат



Зачем необходимо создавать продуцент Артемизинина?

- Стоимость препаратов на основе Артемизинина составляет \$2.25.
 - Стоимость самого активного вещества (Артемизимизин) в препарате составляет \$1.00-1.50 от его стоимости.
 - В большинстве стран третьего мира на медицинское обеспечение тратится менее \$4 в год на человека!
- Для каждого человека, проживающего в странах третьего мира требуется 10-12 доз Артемизимизина в год.
- Годовая потребность в Артемизинине составляет 700 т.

Генно-инженерное производство Артимизинина:

Преимущества:

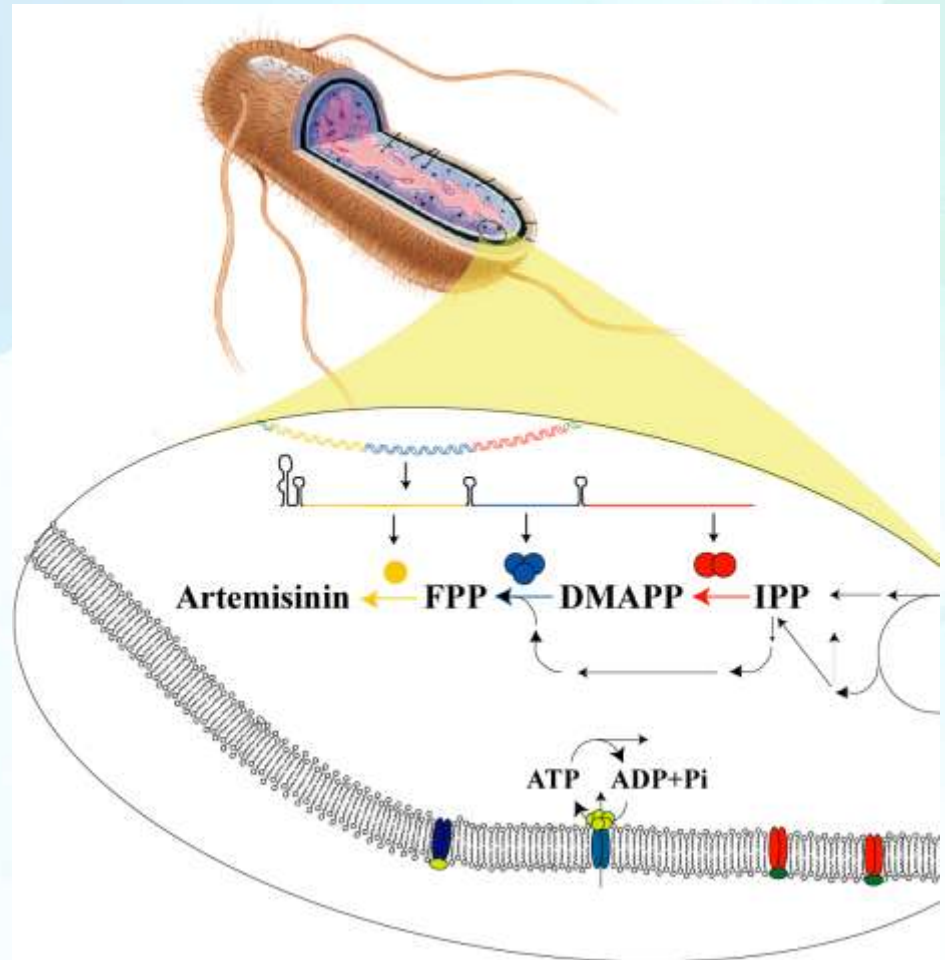
- Микробиологический синтез достаточно просто масштабируется;
- В качестве субстрата для производства могут быть использованы недорогие субстанции.

Проблемы:

- Необходимость конструирования в продуценте всех ферментов, входящих в путь биосинтеза Артимизинина.
- Не всегда просто получается совместить и осуществить эффективную экспрессию генов из разных организмов
- Существует необходимость баланса метаболических путей для оптимизации продукции целевого вещества;
- Необходимость выбора продуцента с хорошо охарактеризованным геномом и разработанными методами инженерии.

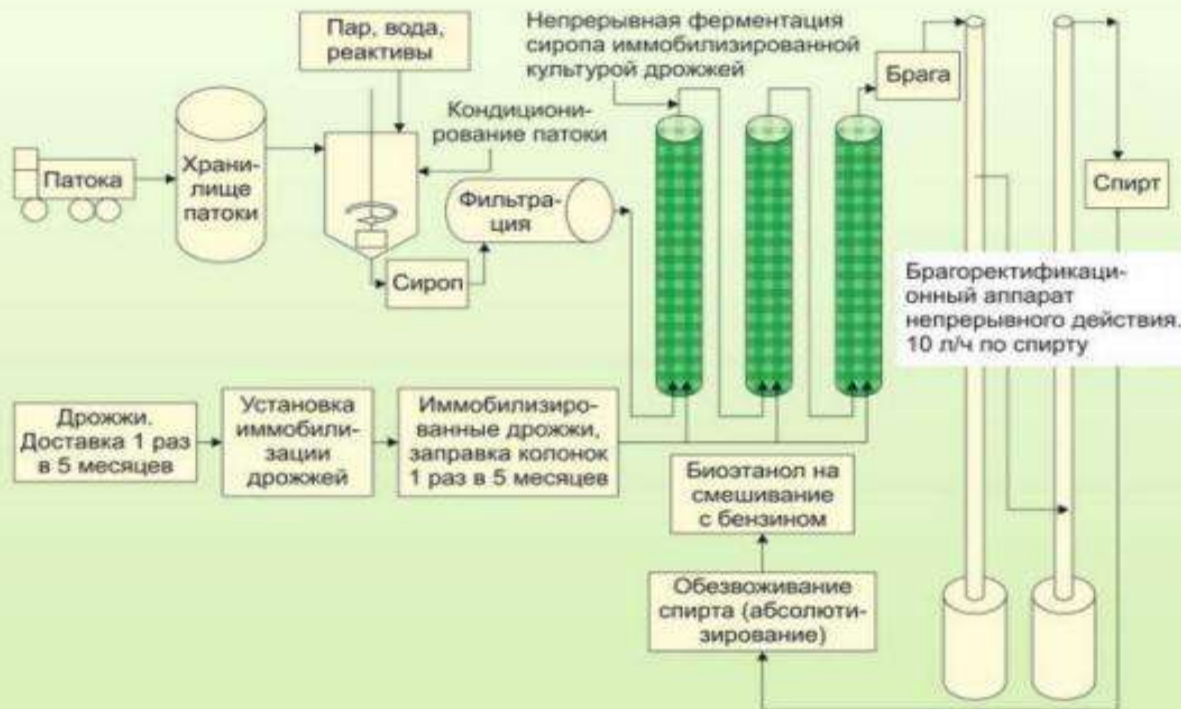
Создание продуцента Артемизинина в *E. coli*

- Клонирование генов из *Artemisia annua* в *E. coli*
- Разработка систем контроля генной экспрессии
- Расчет требуемого количества внутриклеточных предшественников Артемизинина.



Применение методов метаболической инженерии в производстве биотоплив

- Основные субстраты:
- Крахмал – первое поколение
- Лигноцеллюлоза (древесина) – второе поколение



Основные виды биотоплив

- Биоэтанол
- Биодизель – метиловые эфиры жирных кислот
- Биобутанол – превосходит по своим качествам биоэтанол, токсичен для клеток
- Green diesel – дрожжи и микроводоросли с высоким содержанием жиров

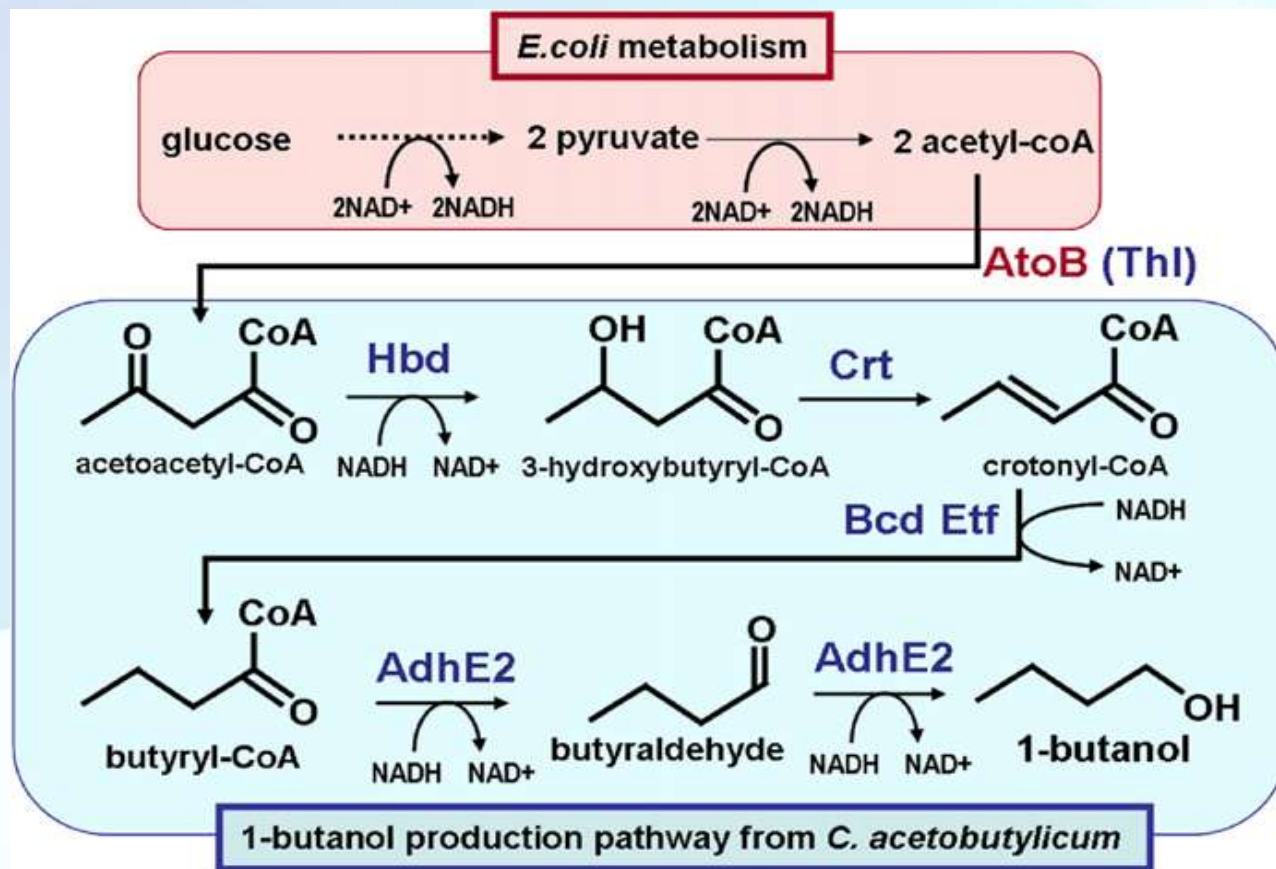


LS9, INC.
the renewable petroleum company™

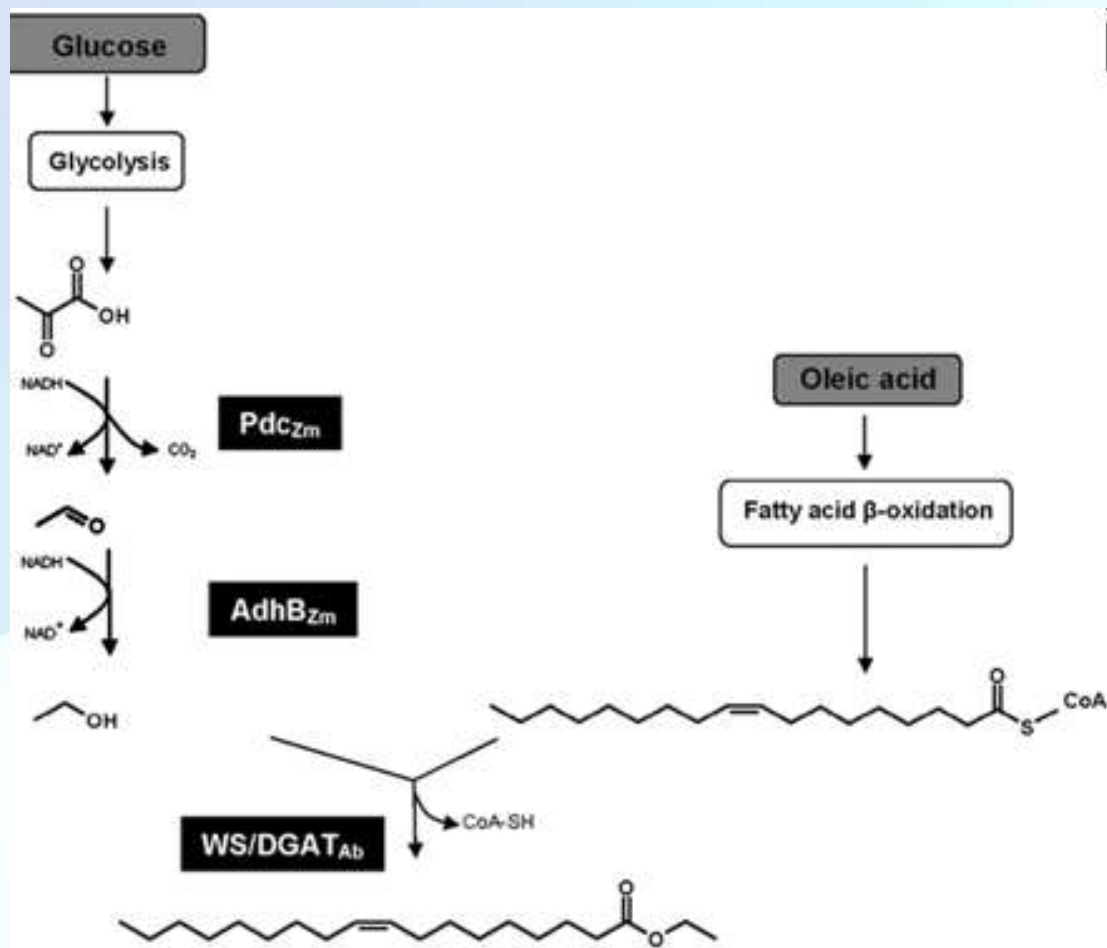


SYNTHETIC GENOMICS™

Разработка продуцента бутанола в клетках *E. coli*.



Разработка продуцента биодизеля в клетках *E. coli*.



Крупнотоннажные производства химических веществ с применением биотехнологий

Биополимеры

Полилактиды, получаемые путем ферментации из крахмала

Бренд «Ingeo»

Быстрорастущий рынок

Распространяются повсеместно в США



1,3-пропандиол

Производство из глюкозы

Снижение энергозатрат на 40% по сравнению с традиционным процессом

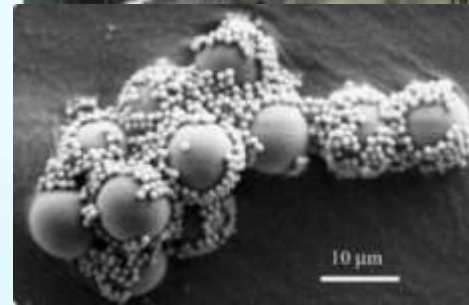
Производство 40 тыс. тонн/год,

Высокий спрос на рынке

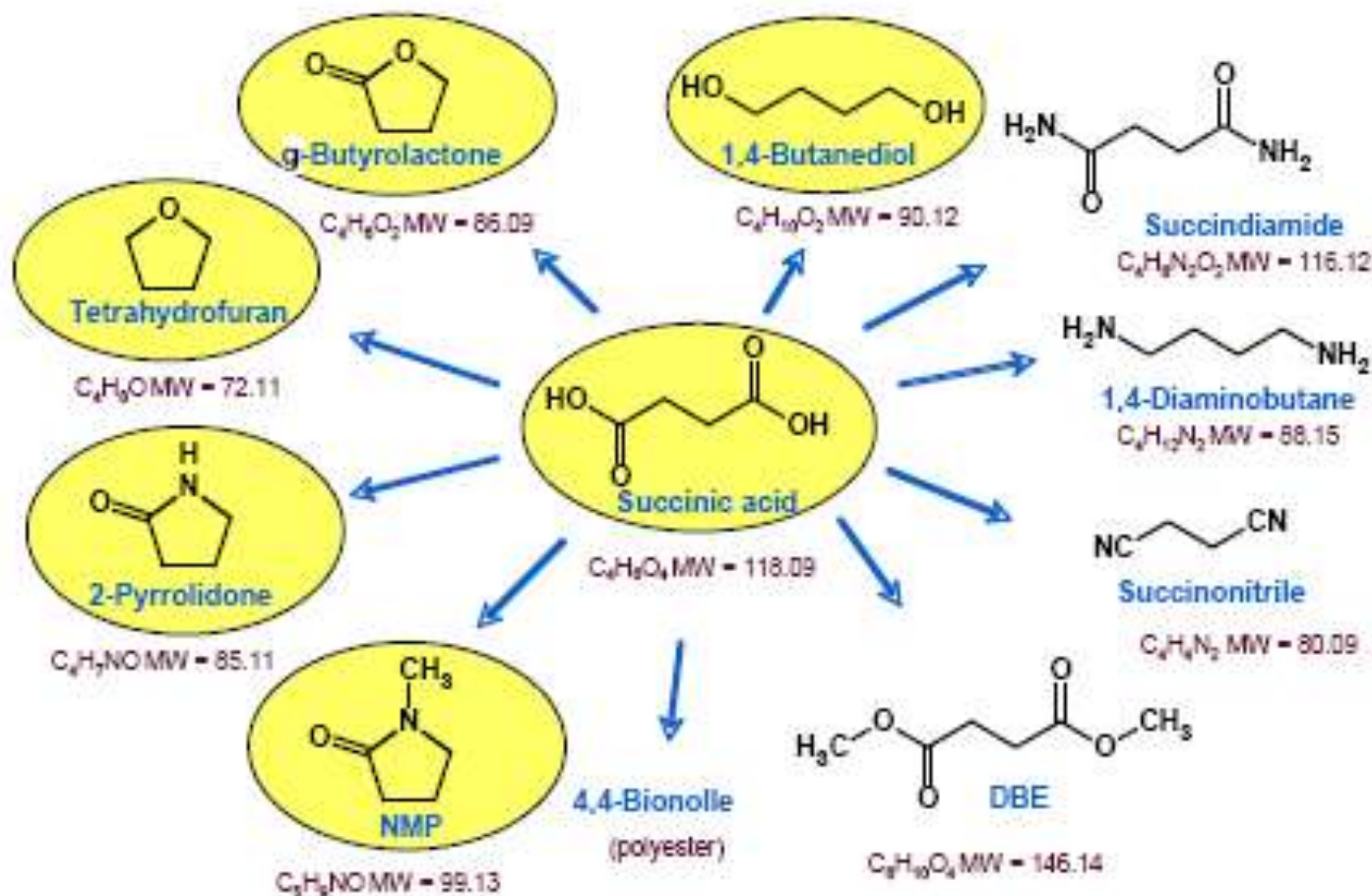


Биокатализаторы

- Акриламид Mitsubishi Rayon
- Витамин B2
- Аскорбиновая кислота
- Производство маргаринов, масел

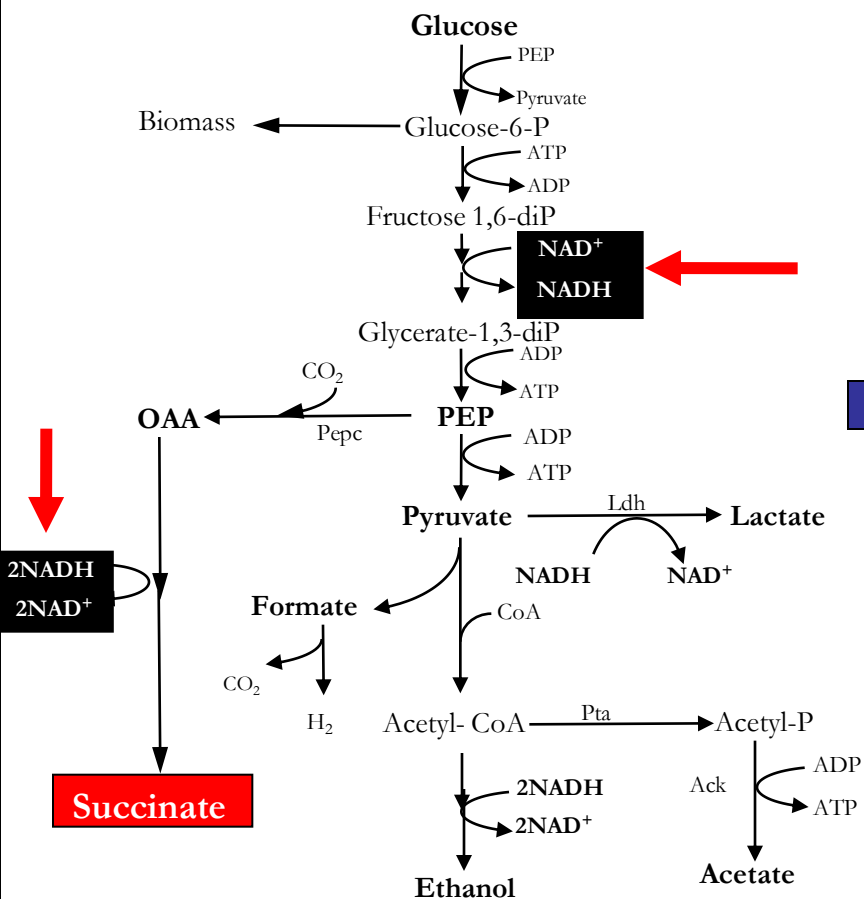


Метаболическая инженерия продукции янтарной кислоты



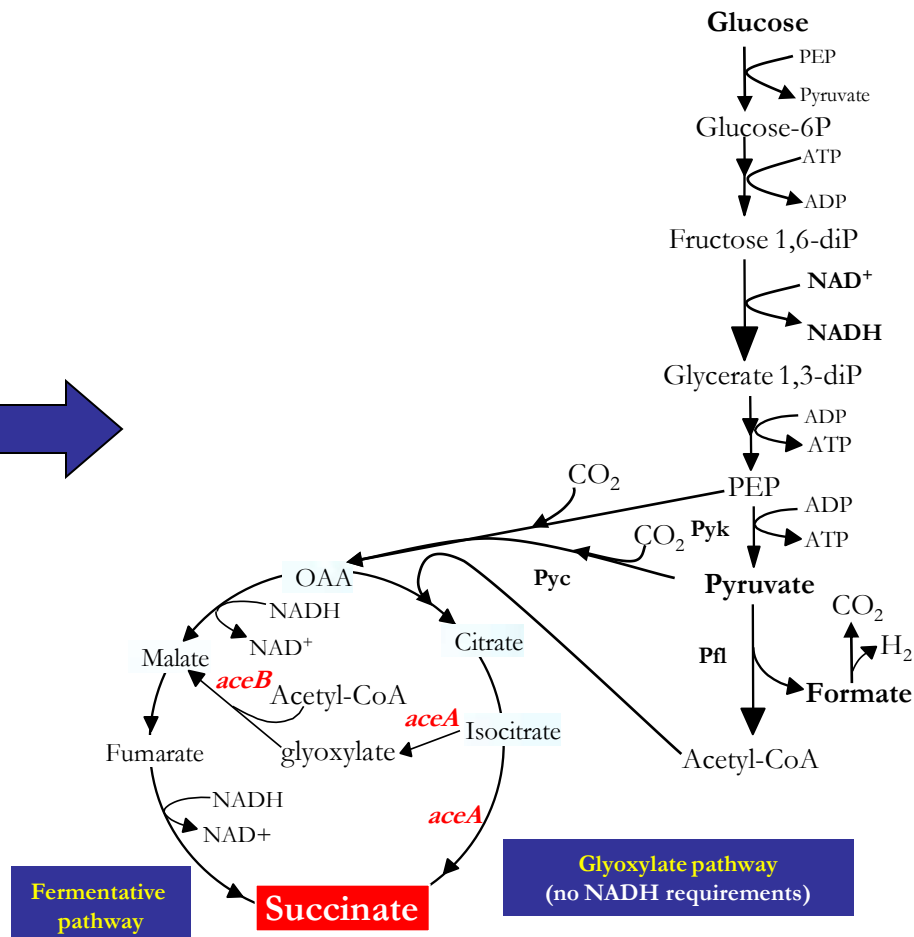
Succinic Acid Chemistry to Derivatives

Анаэробное сбраживание глюкозы *E. coli*



Лимитация метаболизма по
NADH
1 mol/mol

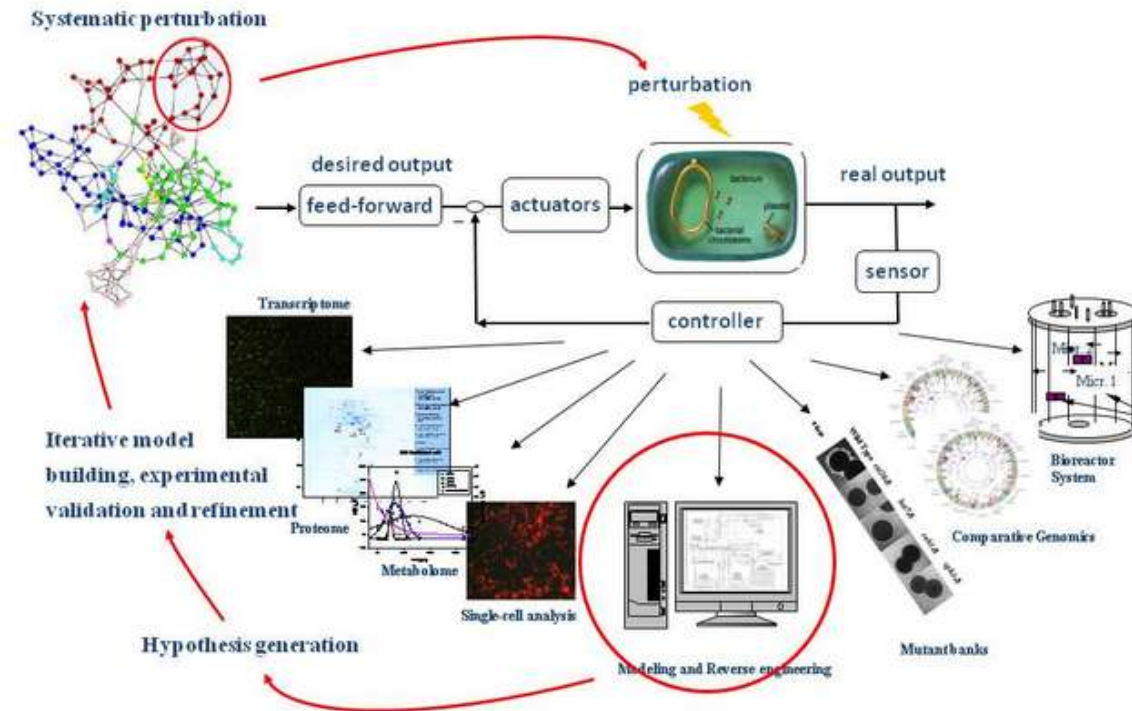
Синтетический метаболизм глюкозы *E. coli*



выход = 1.6 mol/mol

Синтетическая биология

- создание минимальной клетки, выполняющей определенные функции – производство биотоплив, поглощение CO_2 , лекарств и др.



Mycoplasma laboratorium
Создана
в J. Craig Venter Institute

Компания Chevron
инвестировала 600 млн \$
в создание штамма
микроводоросли,
продуцирующего липиды

