

Wiele twarzy biotechnologii

Konwencja o różnorodności biologicznej ONZ definiuje biotechnologię jako *zastosowanie technologiczne, które używa systemów biologicznych, organizmów żywych lub ich składników, żeby wytwarzać lub modyfikować produkty lub procesy w określonym zastosowaniu*. Oznacza to, że biotechnologia wykorzystuje metody stosowane od tysięcy lat, ale na skalę przemysłową (np. w produkcji piwa i przetworów mlecznych). Nowoczesna biotechnologia modyfikuje organizmy na potrzeby prowadzonych przez nią procesów (np. drożdże produkujące insulinę), w przeciwieństwie do biotechnologii tradycyjnej, która sięga po naturalne enzymy i organizmy.

Joanna Stojak

Dziedzina ta dzieli się na cztery gałęzie. Biotechnologia biała (przemysłowa) dotyczy przemysłu i ochrony środowiska, stosuje bioproceny i biokatalizę. Biotechnologia czerwona (medyczna) prowadzi badania z zakresu ochrony zdrowia i diagnostyki genetycznej oraz jest przydatna w produkcji nowych farmaceutyków i opracowywaniu skutecznych terapii genowych. Zielona gałąź biotechnologii wykorzystuje metody inżynierii genetycznej w rolnictwie do poprawy produkcji roślinnej i zwierzęcej. Ustawodawstwem zajmuje się biotechnologia fioletowa.

Biotechnologia jest dziedziną bardzo szeroką i nie sposób opisać tutaj wszystkich jej osiągnięć i zamierzeń. Warto jednak przyjrzeć się bliżej kilku najbardziej spektakularnym i ważnym z punktu widzenia zwykłych ludzi. Czas zaprezentować biotechnologię, z którą spotykamy się codziennie.

Współcześni eskulapowie

Głównym celem biotechnologii medycznej jest poszukiwanie aktywnych biologicznie struktur, które mogłyby zostać zastosowane przy produkcji leków i kosmetyków. Coraz popularniejsze stają się wykorzystywanie komórek macierzystych w leczeniu różnych schorzeń, a także coraz skuteczniejsza jest terapia genowa czy ksenotran-

splantologia (przeszczepianie tkanek lub narządów pochodzących od organizmu należącego do innego gatunku).

Dużym sukcesem jest produkcja na skalę przemysłową przeciwciał monoklonalnych (wykazujących jednakową swoistość i podobne powinowactwo w stosunku do określonego epitopu antygeny). Przeciwciała te wytwarzane są przez komórki hybrydowe uzyskane w wyniku fuzji komórki limfocyty B (zwykle pochodzącego z klonalnej linii komórkowej) wytwarzających przeciwciała o znanej swoistości z nowotworowymi komórkami szpiczaka (nowotwór układu krwiotwórczego). Komórkę hybrydową charakteryzuje zdolność wytwarzania homogennych i specyficznych przeciwciał – takich, jakie wytwarzał użyty do fuzji limfocyt B, oraz nieśmiertelność (czyli zdolność do nieograniczonej liczby podziałów) komórek szpiczaka.

Biotechnologia medyczna udoskonala i ułatwia diagnostykę molekularną chorób genetycznych, wykorzystując takie techniki, jak: PCR (łańcuchowa reakcja polimerazy, ang. *Polymerase Chain Reaction*), FISH (fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*, ang. *Fluorescent In Situ Hybridization*) i sekwencjonowanie DNA (szczególnie coraz szerzej stosowane techniki sekwencjonowania wysokoprzepustowego).

Jak nawarzyć sobie piwa?

Piwo jest napojem niezwykle popularnym od wielu tysiącleci – warzono je już w Mezopotamii 4000 lat p.n.e. Głównym jego

składnikiem, poza wodą, jest jęczmień, z którego produkowany jest słód poddawany fermentacji.

Produkcja piwa składa się z kilku etapów, z których pierwszym jest słodowanie. Celem słodowania jest uaktywnienie procesów fizykochemicznych charakterystycznych dla kiełkowania jęczmienia, a także wyprodukowanie jak największej ilości enzymów amylolitycznych, proteolitycznych i cytolitycznych, rozluźniających strukturę ziarna jęczmienia.

Proces rozpoczyna się od czyszczenia i sortowania ziarna (według ciężaru i wymiarów), moczzonego następnie przez około trzy dni, aby usunąć z niego substancje goryczkowe, które negatywnie wpływają na smak piwa. Ziarno pęcznieje i zmienia barwę ze słomkowożółtej na brązową. Przez kolejny tydzień ziarno kiełkuje. Słody ciemne (typu monachijskiego) potrzebują jęczmienia zawierającego więcej białka i wyższej aktywności enzymów niż słody jasne (typu pilzneńskiego), dlatego poddawane są procesowi kiełkowania znacznie dłużej. Słody wiedeńskie, stanowiące formę pośrednią między dwoma typami wymienionymi wyżej, wymagają warunków pośrednich.

Następnie słód suszy się (około dwóch dni), aby zatrzymać funkcje życiowe zarodka. W przypadku słodów jasnych początkowe suszenie zachodzi w temperaturze 45–50°C, po czym następuje trzy- lub czterogodzinna faza prażenia w 85°C. W wypadku słodów ciemnych faza prażenia trwa pięć godzin i odbywa się w temperaturze 105°C. Słód

pozbawiony gorzkich korzonków jest magazynowany i pozostawiony do dojrzewania na 4–6 tygodni.

Drugim etapem produkcji piwa jest przygotowanie brzeczki. Słód jest rozdrabniany, bielmo miazdżone (powstaje śruta), a znajdujące się w nim substancje ulegają rozpuszczaniu w wodzie. Intensywne zacieranie zapewnia dalszy rozkład enzymatyczny (hydroliza) skrobi i białek. Zależnie od rodzaju produkowanego piwa zacieranie przebiega w ściśle określonych warunkach temperaturowych i czasowych. Wraz ze wzrostem temperatury skrobia rozkłada się do dekstryny i dalej do maltozy, cukru fermentującego (to jego zawartość wpływa na ilość alkoholu w piwie). Z kolei pozostałe w roztworze białka i produkty ich hydrolizy wpływają na barwę, pienistość i klarowność trunku. Po filtracji zacieru w kadzi powstaje brzeczka przednia, gotowana następnie z chmielem w kotle warzelnym (powstaje brzeczka gorąca). Na 100 litrów piwa potrzeba 200 gramów chmiele. Gotowanie (maksymalnie trzy godziny, najczęściej 45–60 minut) ma zniszczyć enzymy i zagęścić brzeczke. Po oddzieleniu gorącego osadu w kadzi wirowej i schłodzeniu mieszaniny otrzymuje się brzeczke nastawną, którą następnie się natlenia i poddaje fermentacji.

Proces fermentacji wymaga intensywnego mieszania. Trwa on od czterech do sześciu dni i składa się z dwóch etapów: fermentacji głównej i wtórnej. Fermentacja główna rozpoczyna się zaraz po dodaniu do brzeczki drożdży, a kończy się, gdy wyczerpie się zapas tlenu i drożdże zginą. Podczas tego etapu zachodzi fermentacja alkoholowa, która polega na rozkładzie cukrów fermentujących na etanol, dwutlenek węgla i inne produkty uboczne. Ze względu na typ drożdży wyróżnia się dwa rodzaje fermentacji. Fermentacja dolna zachodzi w temperaturze 5–13°C, a drożdże osadzają się na dnie kadzi fermentacyjnej. Fermentacja górna przebiega w temperaturze 15–25°C, a drożdże gromadzą się na górze kadzi. Ciemne piwa

Ramka 1. Wybrane komercyjne modyfikacje genetyczne

GATUNEK	UZYSKANA CECHA
Buraki cukrowe (<i>Beta vulgaris</i>)	• odporność na herbicydy, szkodniki • możliwość dłuższego magazynowania bez strat w zawartości cukru
Kukurydza (<i>Zea mays</i>)	• odporność na owady
Pomidor (<i>Lycopersicon</i> sp.)	• cieńsza skórka • wolniejsze dojrzewanie (trwałość)
Truskawki (<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>)	• odporność na mróz • słodszy smak
Winogrona	• odmiany bezpestkowe
Ziemniak (<i>Solanum tuberosum</i>)	• wzrost zawartości skrobi • odporność na herbicydy, stonkę i wirusy • „słodkie ziemniaki” zawierające taumatynę – słodkie białko • eliminacja ciemnienia poudzerzeniowego (trwałość) • mała zawartość glikoalkaloidów szkodliwych dla człowieka, występujących w surowych ziemniakach

wymagają wyższej temperatury fermentacji niż piwa jasne.

Młode piwo (zwane również zielonym) powstałe w czasie fermentacji głównej podlega leżakowaniu, podczas którego zachodzi dalsza fermentacja maltozy (fermentacja wtórna), piwo nasycza się dwutlenkiem węgla i klaruje. Teraz nabiera ono smaku. Klasycznie leżakowanie trwa od czterech do sześciu tygodni, w browarniczych tanko-fermentatorach czas ten skraca się jednak do 2–3 tygodni.

Teraz piwo należy już tylko przefiltrować na membranach filtracyjnych i dokonać pasteryzacji (dwie minuty w 70°C), bez której piwo należałoby spożyć bardzo szybko. Zabutelkowane trafia na półki naszych przydomowych sklepów.

Winna latorośl

Proces winifikacji, w porównaniu z procesem warzenia piwa, z pozoru wydaje się bardzo łatwy. Nic bardziej mylnego – nie bez powodu na świecie można skosztować wina o tysiącach bukietów smakowych i tradycyjnych wyrobów regionalnych. Fermentację alkoholową przeprowadza się z wykorzystaniem drożdży, jednak to od winiarza zależy jaka temperatura

i czas fermentacji zostaną zastosowane. W niektórych winach (ale tylko czerwonych i różowych) po zakończeniu fermentacji alkoholowej przeprowadza się dodatkową fermentację jabłkowo-mlekową, w której bakterie kwasu mlekowego degradują kwas jabłkowy do kwasu mlekowego, obniżając kwasowość wina. Proces ten nazywany jest biologicznym odkwaszaniem.

Początkową produkcję moszczu przygotowuje się zależnie od koloru wina. Wina białe potrzebują jedynie wyciśniętego soku z winogron, aby jednak nadać kolor winom różowym i czerwonym, winogrona należy wcześniej poddać wstępnemu procesowi maceracji – winogrona (razem ze skórką) umieszczane są w kadziach, w których zachodzi samoczynna fermentacja wstępna.

Do fermentacji alkoholowej potrzebny jest oczywiście cukier. Zależnie od jego ilości otrzymuje się wina wytrawne (do 10 g/l), półwytrawne (10–30 g/l), półsłodkie (30–60 g/l), słodkie (60–150 g/l) i likierowe (powyżej 150 g/l).

Również sposób filtrowania gotowego wina zależy od producenta. Wino można przepuścić przez nastaw dwutlenku siarki, co pozbawia je drobnoustrojów

i zapewnia szybsze wypadanie osadu. Niektóre winiarnie stosują dekantację klarownego trunku znad osadu. Bez wątpienia zatem wino jest produktem wartościowym – kulinarnie i zdrowotnie.

Mleczna droga

Innym rodzajem fermentacji szeroko stosowanym w biotechnologii jest fermentacja mlekowa. To dzięki niej podczas zakupów mamy duży wybór przetworów mlecznych, kwaszonych ogórków i kapusty, surowych wędlin (np. salami) oraz chleba wyprodukowanego na zakwasie. Fermentacja węglowodanów do kwasu mlekowego zachodzi z udziałem bakterii fermentacji mlekowej. Bakterie homofermentatywne fermentują węglowodany, produkując tylko kwas mlekowy, z kolei bakterie heterofermentatywne produkują dodatkowo kwas octowy i etanol. W środowisku występują również bakterie zwane fakultatywnymi heterofermentatywnymi, które zależnie od panujących warunków wywołują jeden lub drugi sposób fermentacji mlekowej.

Właściwą fermentację mlekową powodują bakterie z rodzaju *Lactococcus* (homofermentatywne), *Leuconostoc* (heterofermentatywne) i *Lactobacillus* (fakultatywne).

W produkcji jogurtów (zwanych również mlekiem bułgarskim) uczestniczą bakterie *Streptococcus salivarius* i *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*. Proces fermentacji podczas produkcji jogurtów z mleka trwa od czterech do siedmiu godzin w temperaturze 42–45°C. Przez dwie pierwsze godziny fermentację przeprowadzają bakterie *S. salivarius* zakwaszające środowisko i tym samym stwarzające lepsze warunki do działania *L. delbrueckii*. Aby produkt zasłużył na miano jogurtu, żywe kultury bakterii jogurtowych nie mogą występować w nim w liczbie mniejszej niż 10 milionów komórek na mililitr objętości jogurtu.

Z kolei do wytworzenia kefiru niezbędne są dwa rodzaje fermentacji: mlekowa i alkoholowa. Kefir zawiera ziarna kefirowe, czyli

Ramka 2. Nie tylko ludzie modyfikują rośliny

Agrobacterium tumefaciens – bakteria z rodziny *Rhizobiaceae* odpowiedzialna za powstawanie guzów na korzeniach ponad 600 gatunków roślin. Bakterie wnikają przez skaleczenia do tkanek, kolonia rozrasta się w postaci narośli. Następuje „wstrzyknięcie” i wbudowanie w genom roślinny fragmentu bakteryjnego T-DNA, wyciętego z plazmidu Ti. Powoduje to rozpoczęcie produkcji nieprzydatnych roślinie, ale ważnych dla metabolizmu bakterii opin.

Plazmid Ti – plazmid indukujący guzowacenie (ang. *tumor inducing plasmid*). Rozbrojony plazmid (bez fragmentu odpowiedzialnego za powstawanie guzów) wykorzystywany jest przez biotechnologów do transformacji genetycznych.

T-DNA (transformujący DNA) – kolista cząsteczka DNA zawierająca geny niezbędne do formowania guza (m.in. kodujące enzymy szlaku biosyntezy hormonów roślinnych: auksyn i cytokin) oraz geny odpowiedzialne za produkcję opin.

naturalne skupiska wielu bakterii i drożdży żyjących w symbiozie. Dominującymi w ziarnach kefirowych gatunkami są *Lactobacillus lactis* i *Leuconostoc mesenteroides*.

Biotechnologia jest wykorzystywana jednak nie tylko w przemyśle spożywczym – potrafi naprawiać również błędy człowieka.

Jak pozbyć się plamy?

Człowiek eksploatuje środowisko w niezwykłym stopniu, wciąż wprowadzając do niego coraz więcej zanieczyszczeń – celowo lub nieświadomie. Szczególnie uporczywe okazują się zanieczyszczenia ropopochodne oraz metale ciężkie – wyciek do wód, gleby, powietrza. Szybki rozwój przemysłu doprowadził świat do punktu, w którym już nie potrafimy bez niego funkcjonować, musimy zatem opracowywać nowe metody łagodzące jego skutki.

Bioremediacja korzysta z naturalnych zdolności mikroorganizmów, polegających na usuwaniu zanieczyszczeń z wykorzystaniem procesów katalizowania transformacji substancji toksycznych w formy mniej szkodliwe lub neutralne dla środowiska. Proces ten przebiega samorzutnie, „wabiąc” zanieczyszczeniami organizmy, które się nimi żywią. Rolą biotechnologa jest ukierunkowanie lub wzmocnienie tego działania.

Aby przyspieszyć bioremediację, można wykorzystać biostymulację, np. przez dostarczenie do podłoża odpowiednich pożywek, lub bioaugmentację – przez wprowadzenie do środowiska dodatkowych mikroorganizmów (tzw. szczepienie gleby).

Szczególnym przypadkiem bioczyszczania jest fitoremediacja wykorzystująca zdolność niektórych roślin do gromadzenia metali ciężkich w swoich tkankach.

Wydajnym rozwiązaniem okazują się modyfikowane genetycznie mikroorganizmy, które mają zdolność większej akumulacji metali ciężkich (np. modyfikowana gorczyca) lub sprawniejszego metabolizmu zanieczyszczeń ropopochodnych.

Zadaniem biotechnologa jest zapewnienie bioremediującym mikroorganizmom optymalnych warunków działania, czyli: wilgotności (25–80%), zależnego od rodzaju organizmu natlenienia (tlenowce lub beztlenowce), potencjału redoks, pH (5,5–8,5), temperatury (4–45°C) i zawartości pierwiastków biogennych (stosunek C : N : P ~ 120 : 10 : 1).

Zaawansowane rolnictwo

Wiele z występujących w rolnictwie problemów może zostać rozwiązanych za pomocą metod

biotechnologicznej modyfikacji genetycznej. Rośliny transgeniczne mają tak zmodyfikowany DNA, że rolnik łatwo uzyskuje pożądaný efekt fenotypowy.

Pierwszym komercyjnym produktem biotechnologii był wyprodukowany w 1994 roku pomidor FlavrSavr. Był on odporniejszy na gnicie dzięki wprowadzeniu do jego genomu genu powstrzymującego produkcję enzymu poligalakturnazy, która jest odpowiedzialna m.in. za rozkład ściany komórkowej podczas dojrzewania owoców.

Udało się również stworzyć pomidor odporny na suszę. Dzięki dodatkowemu genowi AVP1 roślina miała większy i silniejszy system korzeniowy, w konsekwencji wydajniej wykorzystując zasoby wody. Test wykazał, że tak zmodyfikowany pomidor dobrze zniósł trzynastodniową suszę, a po podlaniu odzyskał żywotność. W przypadku niezmiennych genetycznie roślin zaobserwowano ich obumieranie po pięciu dniach suszy. Praca biotechnologów polegała na wzmocnieniu aktywności genu obecnego u wszystkich roślin, a zatem odporność na suszę można zwiększyć również u innych roślin uprawnych.

Modyfikacje genetyczne umożliwiają więc podniesienie odporności roślin na niekorzystne warunki środowiska: mróz, wysoką temperaturę, zasolenie, szkodliwe promieniowanie. Dzięki temu rośliny mogą być uprawiane na terenach niekorzystnych, a powierzchnie upraw mogą zostać zwiększone.

Co jeszcze można ulepszyć?

Najpowszechniejszą modyfikacją uodparnianie roślin na herbicydy przez wzmocnienie istniejącego naturalnie lub wprowadzenie nowego genu odpowiedzialnego za produkcję enzymu rozkładającego herbicydy (m.in. w kukurydzy, soi, tytoniu).

Aby ograniczyć lub wyeliminować stosowanie insektycydów, uodparnia się rośliny na owady, wbudowując w ich DNA gen Bt. Gen ten, kodujący toksyczne dla owa-



Szalony naukowiec

dów białko Cry, uzyskiwany jest z bakterii glebowej *Bacillus thuringensis*. Białko jest toksyczne dopiero w przewodzie pokarmowym określonego szkodnika (po zjedzeniu tkanek rośliny owad umiera), nie będąc toksycznym dla innych gatunków, w tym człowieka.

Ważna jest również odporność na choroby. W przypadku chorób wirusowych modyfikacja polega na wprowadzeniu do rośliny białek kapsydu i enzymów wirusowych (replikazy, proteazy), dzięki czemu po zetknięciu się z wirusem infekcja jest słabsza lub uwidacznia się z dużym opóźnieniem (np. tytoń odporny na wirusa mozaiki tytoniowej, TMV). W wypadku chorób wywołanych przez grzyby i bakterie do DNA rośliny wprowadzany jest gen kodujący enzymy niszczące ścianę komórkową (hitynaza, glukonaza) lub błonę komórkową (osmotyna) organizmów chorobotwórczych.

Biotechnologia umożliwia poprawę wielu innych cech jakościowych i użytkowych, m.in. opóźnienie dojrzewania i tym samym dłuższą trwałość (np. owoców), wzrost syntezy skrobi i glutenu (lepsza jakość mąki), większą liczbę mikroelementów, usuwanie substancji alergicznych, produkcję białek odżywczych, lepszy smak i aromat (np. kawa, która dodatkowo zawierała o 70% mniej kofeiny). Wywołanie u roślin ozdobnych nadprodukcji karotenów nadaje im intensywną barwę, można również otrzy-

wać nowe kolory i intensywny zapach.

Warto wspomnieć o wyprodukowaniu tzw. złotego ryżu. Dzięki modyfikacji ryżu genem żonkila zwiększyła w nim produkcja β -karotenu, prekursora witaminy A, nadając ziarnom żółtą barwę (stąd nazwa). Zakładano również stworzenie sorgo zawierającego prowitaminę A i E oraz żelazo, cynk i podstawowe aminokwasy, w które była uboga dieta mieszkańców Afryki. To właśnie sorgo zostało wybrane jako nośnik brakujących składników pokarmowych, ponieważ roślina ta doskonale radzi sobie w półsuchych warunkach, w których inne rośliny, na przykład kukurydza, nie przetrwałyby.

Polacy także mogą pochwalić się osiągnięciami w tej dziedzinie. W Instytucie Chemii Bioorganicznej w Poznaniu pod kierownictwem prof. Legockiego stworzono sałatę produkującą szczepionkę na zapalenie wątroby typu B.

Biotechnologia się opłaca

Biotechnologia dzięki zaawansowaniu technologicznemu pozwala na poznawanie całych genomów przydatnych w licznych analizach porównawczych i kreowaniu użytecznych cech w rolnictwie, produkcji leków nowej generacji oraz prowadzenie wielu badań aplikacyjnych. Ogólnoświatowy projekt poznania ludzkiego genomu (ang. *Human Genome Project*, HUGO) zakładał poznanie pełnej sekwencji nukleotydowej ludzkiego genomu oraz identyfikację genów. Co zaskakujące, okazało się to, że jedynie 20–25 tysięcy genów obecnych w naszym genomie koduje białka.

Przed naukowcami jeszcze jedno wyzwanie i ogrom czekających na odkrycie informacji. Z każdym krokiem jednak zbliżamy się do lepszych rozwiązań w medycynie, przemyśle, rolnictwie i w konsekwencji w codziennym życiu zwykłych ludzi.

mgr Joanna Stojak

Instytut Biologii Ssaków PAN w Białowieży