

Высшее профессиональное образование

С. М. Клунова  
Т. А. Егорова  
Е. А. Живухина

# БИОТЕХНОЛОГИЯ

Учебник



Педагогические  
специальности

С. М. КЛУНОВА, Т. А. ЕГОРОВА, Е. А. ЖИВУХИНА

# БИОТЕХНОЛОГИЯ

## Учебник

*Рекомендовано  
Учебно-методическим объединением  
по специальностям педагогического образования  
в качестве учебника для студентов высших  
учебных заведений, обучающихся по специальности  
«Биология»*



Москва  
Издательский центр «Академия»  
2010

УДК 631.147(075.8)

ББК 30.16я73

K515

Рецензенты:

канд. биол. наук, доц. *Е. А. Калашникова* (зав. кафедрой сельскохозяйственной биотехнологии МСХА им. К. А. Тимирязева);

канд. биол. наук, проф. *Г. И. Ушакова* (Московский государственный открытый педагогический университет им. М. А. Шолохова)

**Клунова С. М.**

**K515 Биотехнология : учебник для высш. пед. проф. образования / С. М. Клунова, Т. А. Егорова, Е. А. Живухина. — М. : Издательский центр «Академия», 2010. — 256 с.**

**ISBN 978-5-7695-6697-4**

В учебнике изложены и обобщены традиционные и новейшие технологии, основанные на достижениях биохимии, молекулярной и клеточной биологии, рассмотрены социально-экономические проблемы и перспективы развития биотехнологии в третьем тысячелетии.

Для студентов учреждений высшего педагогического профессионального образования.

УДК 631.147(075.8)

ББК 30.16я73

*Учебное издание*

**Клунова Светлана Михайловна, Егорова Татьяна Алексеевна,  
Живухина Елена Александровна**

**Биотехнология**

**Учебник**

Редактор *Е. В. Кораблева*. Технический редактор *О. Н. Крайнова*.  
Компьютерная верстка: *Н. В. Протасова*. Корректоры *В. А. Жилкина,  
А. Б. Глазкова*

Изд. № 101115736. Подписано в печать 27.08.2010. Формат 60 × 90/16. Гарнитура «Таймс».

Печать офсетная. Бумага офс. № 1. Усл. печ. л. 16,0. Тираж 1 500 экз. Заказ № 30631.

Издательский центр «Академия». [www.academia-moscow.ru](http://www.academia-moscow.ru)

125252, Москва, ул. Зорге, д. 15, корп. 1, пом. 26б.

Адрес для корреспонденции: 129085, Москва, пр-т Мира, 101В, стр. 1, а/я 48.

Тел./факс: (495) 648-0507, 616-00-29.

Санитарно-эпидемиологическое заключение № 77.99.60.953.Д.007831.07.09 от 06.07.2009.

Отпечатано в соответствии с качеством предоставленных издательством  
электронных носителей в ОАО «Саратовский полиграфкомбинат».

410004, г. Саратов, ул. Чернышевского, 59. [www.sarpk.ru](http://www.sarpk.ru)

*Оригинал-макет данного издания является собственностью  
Издательского центра «Академия», и его воспроизведение любым способом  
без согласия правообладателя запрещается.*

© Клунова С. М., Егорова Т. А., Живухина Е. А., 2010

© Образовательно-издательский центр «Академия», 2010

© Оформление. Издательский центр «Академия», 2010

**ISBN 978-5-7695-6697-4**

## **ПРЕДИСЛОВИЕ**

Потребность в учебнике по биотехнологии для студентов высших педагогических учебных заведений, обучающихся по специальности «Биология», определяется включением этой дисциплины в качестве обязательной в Государственный стандарт обучения по биологии. Данный учебник, подготовленный авторами на базе многолетнего опыта чтения курсов лекций по биотехнологии на биолого-химическом факультете Московского педагогического государственного университета, в полной мере соответствует содержанию Государственного стандарта и программы по биотехнологии для педвузов.

В книге представлены традиционные и новейшие технологии, основанные на достижениях генетической и клеточной инженерии. Изложены прогрессивные методы биотехнологии: конструирование рекомбинантной ДНК, трансгенных растений и животных; технология осуществления сайт-направленного мутагенеза, метаболитной инженерии, клонирования; стратегии создания промышленных штаммов микроорганизмов и обеспечения сверхпродуктивности биообъектов. Значительное внимание уделено вопросам использования биотехнологических процессов для решения актуальных социально-экономических проблем (энергетических, сырьевых, медицинских, экологических, сельскохозяйственных). Обобщены главные достижения биотехнологии в современном производстве; обсуждены прогнозы ее развития.

Материал учебника обеспечит необходимый уровень подготовки студентов-биологов, а также заинтересует специалистов, занимающихся исследованиями в области биотехнологии.

Авторы выражают благодарность С. П. Балобановой, Д. Д. Девятникову и Д. А. Сковородину за оказанную помощь в подготовке книги к изданию.



# ВВЕДЕНИЕ

Последние два десятилетия развития биоиндустрии отмечены выдающимися достижениями в биотехнологии, которая является междисциплинарной областью знаний, базирующейся на микробиологии, биохимии, молекулярной биологии, биоорганической химии, биофизике, вирусологии, иммунологии, генетике, инженерных науках и электронике.

Развитие биотехнологии позволяет существенно интенсифицировать производство, повышать эффективность использования природных ресурсов, решать экологические проблемы, создавать новые источники энергии. Возможности биотехнологии при международном сотрудничестве специалистов могут быть направлены на решение мировых кризисных проблем, связанных с восполнением дефицита белка и энергии, предотвращением опасных заболеваний, охраной окружающей среды.

Одна из особенностей биотехнологии состоит в том, что она использует технологии производства продуктов на ранних этапах развития микробиологического синтеза. Выявлены существенные потенциальные возможности для усовершенствования традиционных технологий и расширения сфер приложения получаемых продуктов. Например, методом генетической инженерии созданы уникальные штаммы микроорганизмов для сыроварения.

Разработка биотехнологических процессов связана с большими капиталовложениями. Внедрение новейших биотехнологий особенно перспективно в тех случаях, когда продукт не может быть получен другими способами или может быть получен в недостаточных количествах, по более высокой цене. Исследования в этом направлении в основном сосредоточены на производстве фармакологических препаратов, диагностикумов.

Иммунная биотехнология, с помощью которой распознают и выделяют из смесей одиночные клетки, может применяться не только непосредственно в медицине для диагностики и лечения, но и в научных исследованиях, в фармакологической, пищевой и других отраслях промышленности, а также использоваться для получения препаратов, синтезируемых клетками защитной системы организма.

Большое будущее биотехнологии связано с протоинженерией — технологией изменения свойств природных белков на генетическом уровне, получения новых белков (например, новых стимуляторов роста растений, инсектицидов, активных и устойчивых ферментов, высококачественных пищевых продуктов, биосенсоров и биоэлементов, медицинских приборов).

Важную роль в указанном направлении играют расширение и усовершенствование существующих биотехнологических процессов, создание новых. В частности, большие перспективы связаны с введением в растение комплекса генов, управляющих фиксацией азота.

Растущая область биотехнологии — биоэлектроника. Использование биосенсоров революционизирует методы измерения и контроля в различных отраслях промышленности, медицине, научных исследованиях.

С внедрением биотехнологии в добывающую промышленность связан переход от тяжелой индустрии к высоким технологиям. Применение биотехнологии металлов перспективно для извлечения из руд платины и других драгоценных и стратегически важных металлов, а биотехнологических методов — для увеличения извлечения нефти из скважин, удаления серы из угля, метана из шахт.

Внедрение биотехнологии в практику изменяет соотношение в системе: человек — производство — природа, повышает производительность труда. Широкое использование биотехнологических процессов способствует стиранию грани между промышленным и сельским производством, поскольку продукты питания, корма и другие сельскохозяйственные продукты вырабатывают в индустриальных условиях. Так, на фермах применяют установки для переработки сельскохозяйственных отходов в биогаз, используемый для удовлетворения собственных потребностей в топливе; внедряются промышленные методы производства компонентов кормов.

В настоящее время достижения биотехнологии перспективны в следующих отраслях:

- в промышленности (пищевая, фармацевтическая, химическая, нефтегазовая) — использование биосинтеза и биотрансформации новых веществ на основе сконструированных методами генной инженерии штаммов бактерий и дрожжей с заданными свойствами на основе микробиологического синтеза;
- в экологии — повышение эффективности экологизированной защиты растений, разработка экологически безопасных технологий очистки сточных вод, утилизация отходов агропромышленного комплекса, конструирование экосистем;
- в энергетике — применение новых источников биоэнергии, полученных на основе микробиологического синтеза и модели-

рованных фотосинтетических процессов, биоконверсии биомассы в биогаз;

- в сельском хозяйстве — разработка в области растениеводства трансгенных агрокультур, биологических средств защиты растений, бактериальных удобрений, микробиологических методов рекультивации почв; в области животноводства — создание эффективных кормовых препаратов из растительной, микробной биомассы и отходов сельского хозяйства, репродукция животных на основе эмбриогенетических методов;

- в медицине — разработка медицинских биопрепаратов, моноклональных антител, диагностикумов, вакцин, развитие иммунобиотехнологии в направлении повышения чувствительности и специфичности иммуноанализа заболеваний инфекционной и неинфекционной природы.

## БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

К важнейшим отраслям биоиндустрии (рис. 1.1) следует отнести: некоторые отрасли пищевой промышленности (широкомасштабное выращивание дрожжей, водорослей и бактерий для получения белков, аминокислот, витаминов, ферментов); сельское хозяйство (клонирование и селекция сортов растений, производство биоинсектицидов, выведение трансгенных животных и растений); фармацевтическую промышленность (разработка вакцин, синтез гормонов, антибиотиков, интерферонов, новых лекарственных препаратов); экологию — защиту окружающей среды и устранение загрязнений (очистка сточных вод, переработка хозяйственных отходов, изготовление компоста и др.).

Биотехнология призвана не только совершенствовать традиционные методы, широко используемые в пищевой промышленности при производстве молочно-кислых продуктов, сыра, пищевых кислот, алкогольных напитков, но и создавать современные технологии для синтеза полимеров, искусственных приправ, сырья (текстильная промышленность), для получения метанола, этанола, биогаза и водорода, для извлечения некоторых металлов из руд.

### 1.1. ПРОИЗВОДСТВО КОРМОВОГО БЕЛКА

В соответствии с нормами питания человек должен ежедневно получать с пищей 60 — 120 г полноценного белка; в рационе сельскохозяйственных животных на каждую кормовую единицу нужно не менее 110 г полноценного белка. Для поддержания жизненных функций организма, построения клеток и тканей необходим постоянный синтез различных белковых соединений. Если растения и большинство микроорганизмов способны синтезировать все белковые аминокислоты из углекислоты, воды, аммиака и минеральных солей, то человек и животные не могут синтезировать некоторые аминокислоты (валин, лейцин, изолейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан и фенилаланин), которые называют *незаменимыми*. Эти аминокислоты должны поступать в организм в готовом виде с пищей; их отсутствие вызывает тяже-



Рис. 1.1. Перспективные направления биотехнологии в снабжении человечества продовольствием

лые заболевания человека и снижение продуктивности сельскохозяйственных животных.

Главные источники незаменимых аминокислот для человека — белки животного и растительного происхождения, входящие в состав пищи, а для животных — в основном растительные белки. Все незаменимые аминокислоты должны содержаться в белках пищи в определенных соотношениях, отвечающих потребностям данного организма.

Если содержание белков в растительном корме ниже нормы, то во избежание перерасхода кормов и повышения себестоимости животноводческой продукции количество белка в корме компенсируют введением белковых добавок в виде препаратов незаменимых аминокислот либо белковой массы с более высоким содержанием ряда аминокислот по сравнению с эталоном. Незаменимые аминокислоты наиболее сбалансированы в белках семян сои. Относительно высокую биологическую ценность имеют также белки зерна риса и гороха. В белках зерна пшеницы и ячменя очень мало лизина, метионина и изолейцина, а в белках кукурузы еще и триптофана. Для сбалансирования кормов (в которых основной компонент — зерно злаковых культур) по белку и незаменимым аминокислотам применяют концентрированные белковые добавки — комбикорма. Для их приготовления используют мясокостную и рыбную муку, отходы мясной и молочной промышленности, жмыхи масличных растений, отруби, шроты зернобобовых культур.

Особый интерес представляет использование микроорганизмов в качестве источника белка и витаминов при производстве пищевых продуктов. Перспективу и экономическую целесообразность употребления микроорганизмов в технологии производства пищевых продуктов диктует ряд факторов:

- 1) возможность использования самых разнообразных химических соединений, в том числе отходов производства, для культивирования микроорганизмов;
- 2) высокая интенсивность синтеза белков;
- 3) относительно несложная технология культивирования микроорганизмов, которую можно осуществлять круглосуточно и во все сезоны года;
- 4) относительно высокое содержание белка и витаминов, а также углеводов и липидов в препаратах на основе микробов;
- 5) повышенное содержание незаменимых аминокислот по сравнению с растительными белками (табл. 1.1);
- 6) возможность направленного генетического влияния на химический состав микроорганизмов в целях совершенствования белковой и витаминной ценности продукта.

Использование белка микробного происхождения для изготовления пищевых продуктов позволяет экономить высокоценные животные и растительные белки, а также повышать биологическую ценность готового продукта.

Для промышленного производства пищевых продуктов и их использования на основе микроорганизмов необходимы тщательные медико-биологические исследования. Пищевые продукты, получаемые с добавлением микробных препаратов, должны пройти всестороннюю проверку для выявления канцерогенного, мутагенного, эмбриотропного действия на организм человека и жи-

**Содержание незаменимых аминокислот в белках некоторых микроорганизмов (в граммах на 100 г белка)**

Аминокислота	Микроорганизмы				
	дрожжи	водоросли	бактерии	грибы	актиномицеты
Валин	5 — 7	5 — 7	4 — 6	5 — 7	5,5
Лейцин	6 — 9	6 — 10	5 — 11	6 — 9	7,7
Изолейцин	4 — 6	4 — 7	5 — 7	3 — 6	5,3
Треонин	4 — 6	3 — 6	4 — 5	3 — 6	4
Метионин	1 — 3	1,5 — 2,5	2 — 3	2,5	1,3
Лизин	6 — 8	5 — 10	6 — 7	3 — 7	6,4
Фенилаланин	3 — 5	3 — 5	3 — 4	3 — 6	5
Триптофан	1 — 1,5	до 2	1,5	1,5 — 2	1,4

вотных. Токсикологические исследования, усвояемость продуктов микробного синтеза — основные критерии целесообразности технологии их производства.

В настоящее время мировой дефицит белка составляет около 15 млн т. Наиболее перспективен микробиологический синтез, что следует из представленных данных: если для крупного рогатого скота требуется 5 лет для удвоения белковой массы, для свиней — 4 мес, для цыплят — 1 мес, то для бактерий и дрожжей — 1 — 6 ч. Мировое производство пищевых белковых продуктов за счет микробного синтеза составляет более 15 тыс. т в год.

В качестве источников кормового белка чаще используют различные виды дрожжей и бактерий, микроскопические грибы, одноклеточные водоросли, белковые коагуляты травянистых растений.

## 1.2. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДРОЖЖЕЙ И БАКТЕРИЙ

Дрожжевые клетки в качестве источника углерода для роста способны использовать неразветвленные углеводороды с числом от 10 до 30 углеродных атомов в молекуле. В основном они представлены жидкими фракциями углеводородов нефти с температурой кипения 200 — 320 °С. Эти фракции углеводородов нефти могут быть получены низкотемпературной кристаллизацией, кар-

бомидной депарафинизацией и адсорбцией на молекулярных ситах (цеолитах). В России первый завод по производству кормовых дрожжей из жидких парафинов нефти вступил в действие в 1971 г. В нашей стране и ряде стран СНГ из *n*-парафинов нефти производят большое количество кормовых дрожжей (свыше 1 млн т). При выращивании дрожжей на *n*-парафинах нефти в приготовленную из них питательную среду добавляют макро- и микроэлементы, необходимые витамины и аминокислоты. Высушенная дрожжевая масса гранулируется и используется как белково-витаминный концентрат (БВК), содержащий до 50—60 % белковых веществ, для кормления сельскохозяйственных животных.

Хорошим субстратом для выращивания кормовых дрожжей является молочная сыворотка — производственный отход при переработке молока. В 1 т молочной сыворотки содержится около 10 кг белка и 50 кг лактозы. Разработана эффективная технология выделения из молочной сыворотки белков методом ультрафильтрации низкомолекулярных веществ через мембраны. Эти белки используют для приготовления сухого обезжиренного молока. Жидкие отходы, остающиеся после отделения белков (пермеат), могут быть переработаны путем культивирования дрожжей в обогащенные белками кормовые продукты.

В качестве источников углерода дрожжевые клетки могут использовать и низшие спирты — метанол и этанол, получаемые в биотехнологии из природного газа или растительных отходов. Дрожжевая масса, полученная после культивирования дрожжей на спиртах, содержит больше белков (56—62 % от сухой массы) и меньше вредных примесей, чем кормовые дрожжи, выращенные на *n*-парафинах нефти, такие, как производные бензола, *D*-аминокислоты, аномальные липиды, токсины и канцерогенные вещества. Кроме того, кормовые дрожжи имеют повышенное содержание нуклеиновых кислот — 3—6 % от сухой массы, которые в этой концентрации вредно воздействуют на организм животных. В результате их гидролиза образуется много пуриновых оснований, превращающихся затем в мочевую кислоту и ее соли, которые могут быть причиной мочекаменной болезни, остеохондроза и других заболеваний. Тем не менее кормовые дрожжи хорошо усваиваются и перевариваются в организме животных, а по содержанию таких аминокислот, как лизин, треонин, валин и лейцин, значительно превышают многие растительные белки. Вместе с тем белки дрожжей частично не сбалансированы по метионину, в них мало цистеина и селенцистеина. Оптимальная норма добавления дрожжевой массы в корм сельскохозяйственных животных обычно составляет не более 5—10 % от сухого вещества.

Наряду с технологией использования дрожжевых белков в качестве кормовой добавки в рационы сельскохозяйственных животных



разработаны технологии получения из них *пищевых белков*. В некоторых странах пивные и пищевые дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida arborea*, *C. utilis*) широко используют в качестве белковых добавок к различным пищевым продуктам. Дрожжевой белок позволяет повысить питательную и витаминную ценность продуктов, улучшить их вкус и аромат. Так, разработана рецептура приготовления сосисок из мяса индейки с добавлением 25 % белка, дрожжевого хлеба и лапши с частичной заменой муки — до 5 % (США). В результате ферментации дрожжевыми клетками глюкозы, получаемой из кукурузного крахмала, синтезирован белковый продукт мукопротеин, используемый при производстве колбас в качестве замены основного сырья (Великобритания).

Очень полезными продуктами являются ацидофильно-дрожжевое молоко и творог, сделанный из него. Технология получения творога включает следующие этапы. В цельное молоко с 2 % сахара вносят 3 % суточной культуры дрожжей и выдерживают 14 — 17 ч при температуре 32 — 33 °С. Полученную закваску добавляют в молоко и выдерживают до свертывания при температуре 33 °С еще 5 — 6 ч. Такой творог богат витаминами В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, С и др. Представители 14 видов дрожжей рода *Candida* утилизируют молочную сыворотку для получения биомассы, богатой витаминами и белком. Способность некоторых видов дрожжей (*Rhodotorula glutinis*) продуцировать каротиноиды нашла применение в производстве пищевых красителей.

Колбасные изделия с добавлением микропротеина рекомендованы больным, страдающим диабетом и другими хроническими заболеваниями.

Фирмой «Amoco Foods» (США) налажено производство сухих дрожжей *Candida utilis* под названием торутеин, который добавляют в продукты питания. В штате Оклахома (США) разработана технология получения ряда диетических продуктов, обогащенных дрожжевым белком «Provesten T» (фирма «Provesta») с высоким содержанием протеина. Напитки, в которые добавлен препарат, имеют оригинальный вкус.

Важный резерв пищевого белка и витаминов — остаточные пивные дрожжи *Saccharomyces carlsbergensis*. Организм человека усваивает свыше 90 % всех питательных веществ, содержащихся в них. В составе этих дрожжей обнаружено около 14 витаминов, причем на долю витамина В<sub>1</sub> приходится 10 мг %, витамина В<sub>2</sub> — 3 мг %; они характеризуются хорошей сбалансированностью незаменимых аминокислот, белка (не менее 48 %). Пивные дрожжи могут с успехом применяться при производстве колбас в качестве заменителя казеина; они повышают биологическую и витаминную ценность колбас, улучшают их вкус, аромат и другие показатели. Пивные дрожжи применяют для «ароматизации» мяса, тво-

рога и изделий из них. Как правило, биомассу дрожжей при переработке в пищевой белок тщательно очищают. Сначала разрушают стенки дрожжевых клеток путем механической, щелочной, кислотной или ферментативной обработки с последующей экстракцией гомогенной дрожжевой массы подходящим органическим растворителем. После такой очистки от органических и минеральных примесей дрожжевой продукт обрабатывают щелочным раствором для растворения белков. Далее белковый раствор, отделенный центрифугированием от оставшейся массы дрожжей, подвергают диализу. Очищенные от низкомолекулярных примесей белки осаждают, высушивают и используют в качестве белковых добавок в различные пищевые продукты: сосиски, паштеты, мясные и кондитерские начинки. Белки дрожжей применяют также при получении искусственного мяса. Для этого их нагревают с последующим быстрым охлаждением или продавливанием белковой пасты через отверстия малого диаметра. В белковую пасту добавляют полисахариды и другие компоненты.

Известно более 30 видов бактерий, которые могут быть применены в качестве источников полноценного кормового белка. Бактериальные белковые концентраты с содержанием сырого белка 60—80 % (от сухой массы) — ценные препараты в кормопроизводстве. Следует отметить, что бактерии значительно быстрее, чем дрожжевые клетки, наращивают биомассу и, кроме того, белки бактерий содержат больше цистеина и метионина, что позволяет отнести их в разряд белков с высокой биологической ценностью. Источником углерода при культивировании бактерий могут служить природный и попутный газы, водород, а также спирты — метанол, этанол, пропанол. Чаще всего на газовых питательных средах выращивают бактерии рода *Methylococcus*, способные утилизировать до 85—90 % метана в специальных ферментерах. Однако производство кормового белка из газообразных продуктов довольно сложно и дорогостояще. Более широко применяется технология выращивания бактерий на метаноле, который легко получают путем окисления метана. При культивировании на питательной среде с метанолом наиболее часто используют бактерии родов *Methylomonas*, *Pseudomonas*, *Methylophilus*. Масштабное производство кормовых белков на основе использования метанола впервые было организовано в Великобритании. Концерном «Ай-Си-Ай» выпускается кормовой белковый препарат прутин (коммерческое название). В России также разработана технология получения препарата из метанола под названием меприн. В этом препарате содержится до 74 % белков (от сухой массы), до 5 % липидов, 10 % минеральных веществ, 10—13 % нуклеиновых кислот. В настоящее время разрабатывается технология получения кормового белка из этанола на основе культивирования бактерий рода *Acinetobacter* (препарат эприн).

К числу бактерий с высокой интенсивностью синтеза белков следует отнести и водородокисляющие бактерии, способные накапливать в клетках до 80 % сырого белка (в расчете на сухую массу). Для их культивирования в составе газовой среды обычно содержится 70 — 80 % водорода, 20 — 30 % кислорода и 3 — 5 % CO<sub>2</sub>. Производство кормового белка на основе использования водородокисляющих бактерий может быть организовано вблизи химических предприятий.

Кормовой белок бактериального происхождения добавляют в комбикорма в количестве 2,5 — 7,5 % от белка рациона сельскохозяйственных животных, а при кормлении взрослых свиней — до 15 %.

### 1.3. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВОДОРОСЛЕЙ И МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ

Для получения кормового белка используют одноклеточные водоросли *Chlorella* и *Scenedesmus*, синезеленые водоросли из рода *Spirulina*, способные синтезировать белки из диоксида углерода, воды и минеральных веществ за счет энергии солнечного света. Водоросли для своего развития нуждаются в определенных режимах освещения и температуры и в больших объемах воды. Обычно их выращивают в естественных условиях южных регионов в бассейнах открытого типа. Водоросли хлорелла и сценедесмус нуждаются в нейтральной среде, их клетки имеют довольно плотную целлюлозную стенку, вследствие чего они хуже перевариваются в организме животных, чем спирулина, которую выращивают в щелочных озерах (рН 10 — 11). При выращивании водорослей в культиваторах открытого типа с 1 га водной поверхности можно получать до 70 т сухой биомассы в год, что превышает ее выход при возделывании пшеницы, риса, сои, кукурузы.

Содержание белков в клетках *Chlorella* и *Scenedesmus* составляет около 55 % (в расчете на сухую массу), а в клетках *Spirulina* — 65 %. Белки водорослей хорошо сбалансированы по содержанию незаменимых аминокислот, за исключением метионина. В клетках водорослей, кроме того, синтезируется довольно много полиненасыщенных жирных кислот и β-каротина (до 150 мг %).

Белковая масса из клеток водорослей поступает в производство в виде суспензии, сухого порошка или пастообразного препарата. Процесс отделения клеток водорослей от массы воды чрезвычайно трудоемкий. Суточная норма суспензии хлореллы при кормлении молодняка крупного рогатого скота — 3 — 6 л, взрослых животных — 8 — 10 л. В связи с тем что биомасса *Spirulina* характеризуется высоким содержанием белков (до 70 % сухой массы),

хорошо сбалансированных по аминокислотному составу, ее используют для приготовления продуктов питания и кондитерских изделий. Добавление ее в корм (листья шелковицы) тутового шелкопряда значительно увеличивает выход шелка и его качество.

В биомассе многих микроскопических грибов хорошо сбалансированы по аминокислотному составу белки; они включают также витамины и липиды. По своим питательным свойствам белки грибов приближаются к белкам сои и мяса, что позволяет использовать их не только для приготовления кормовых концентратов, но и как добавку в пищу человека. Источником углерода для промышленного выращивания микроскопических грибов служат растительные отходы, содержащие клетчатку, гемицеллюлозы, лигнин, а также торф и навоз. Образцы колбас, выработанные с применением микроскопических грибов, характеризуются высокой степенью перевариваемости белковых веществ *in vitro* за счет активных пепсина и трипсина. Обычно микробная биомасса добавляется в изделия из рубленого мяса в количестве 5 — 15 %. Такой гриб, как *Penicillium roqueforti*, широко используется при производстве сыров, в частности сыра рокфор; он применяется свыше 100 лет. В Великобритании создан пищевой продукт, основным компонентом которого является белок грибного происхождения (*Fusarium graminearum*) — *микопротеин* на дешевом глюкозном сиропе, полученном путем гидролиза пшеничного или кукурузного крахмала. Микопротеин — это аналог мяса, но по сравнению с белками животного происхождения имеющий лучшее качество по содержанию белка (44 %), минеральных веществ, витаминов и липидов. Хорошая перевариваемость грибной белковой массы в организме животных, а также низкий уровень содержания нуклеиновых кислот позволяют использовать ее в качестве кормовой добавки в большей концентрации, чем кормовые дрожжи. При кормлении взрослых животных возможна замена в корме 50 % растительного белка на грибной.

В зависимости от способа подготовки растительного сырья для культивирования микроскопических грибов применяют и соответствующие технологии их выращивания. Более высокий коэффициент использования сырья достигается при выращивании грибов на гидролизатах растительных отходов и жидких отходах деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности по сравнению с их культивированием на твердой питательной среде. Содержание белков в грибной массе при использовании метода глубинного культивирования составляет 50 — 60 % от сухой массы. Для более полного использования сырья практикуется совместное культивирование грибов и бактерий.

# ПРИМЕНЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ПРОБЛЕМ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Специфическое применение биотехнологических методов для решения проблем окружающей среды, таких, как переработка отходов, очистка воды, устранение загрязнений, составляет предмет *экологической биотехнологии*. Экологическая биотехнология — это новейший подход к охране и сохранению окружающей среды при совместном использовании достижений биохимии, микробиологии, генетической инженерии и химических технологий.

## 2.1. ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ И ЕЕ ЗАДАЧИ

Круг проблем, решаемых экобиотехнологией, чрезвычайно широк — от разработки и совершенствования методологии комплексного химико-биологического исследования экосистем вблизи источников техногенных воздействий до разработки технологий и рекомендаций по рекультивации почвы, биологической очистке воды и воздуха и биосинтезу препаратов, компенсирующих вредное влияние изменения окружающей среды на людей и животных. В процессе круговорота загрязняющих веществ в экосистемах огромную роль играют микроорганизмы. Помимо использования деятельности микроорганизмов в пищевой, фармацевтической, химической промышленности и в генной инженерии появилась возможность их применения для переработки отходов жизнедеятельности человека. В связи с ростом городов и развитием промышленности возникли серьезные экологические проблемы: загрязнение водоемов, накопление ядовитых веществ, в том числе канцерогенных, бытового мусора и отходов, загрязнение воздуха. Однако многие из созданных человеком низкомолекулярных соединений (ядохимикаты, детергенты) и высокомолекулярных полимеров оказались устойчивыми и не разлагаются микроорганизмами, т. е. требуется разработка более усовершенствованных технологий.

Обычно для утилизации отходов применяют комплексы микроорганизмов и специальные приборные устройства. Многие из созданных человеком химических веществ проявляют биологиче-

**Перечень веществ, опасных для жизнедеятельности человека**

Вещества, проявляющие канцерогенный, мутагенный эффект	Вещества, вызывающие резистентность у вредителей, патогенов и сорняков	Вещества, стимулирующие откладку яиц и размножение вредителей
<p><i>Хлорорганические:</i> ДДТ, полихлорпирен, полихлоркамфен, гексахлорбутадиен.</p> <p><i>Производные дитиокарбаминовой кислоты:</i> цирам, цинеб, ТМТД.</p> <p><i>Производные карбаминовой кислоты:</i> беномил, пиримор, бетанал.</p> <p><i>Производные мочевины:</i> которан.</p> <p><i>Другие:</i> хлорофос, фталофос, базудин, гетерофос, дихлофос, каптан, фолфет, каптофол</p>	<p><i>Инсектициды и акарициды:</i> ДДТ, токсафен, эндрин, малатион.</p> <p><i>Фосмет, хлорофос, арамит.</i></p> <p><i>Фунгициды:</i> медный купорос, каптан, агрозан, додин, фталан, цинеб, родан, фигон</p>	<p>ДДТ, меркаптофос, диметеоат, метилмеркаптофос</p>

скую активность: обладают мутагенными, канцерогенными, тератогенными свойствами, нарушают структуру клетки. В табл. 2.1 представлен ряд веществ, обладающих опасным для человека действием.

Некоторые загрязняющие биосферу вещества по своему происхождению являются природными соединениями. Например, компонент древесины лигнин, образующийся в значительных количествах как отход целлюлозно-бумажной промышленности, — опасный поллютант. К числу загрязняющих биосферу веществ природного происхождения принадлежат и многие ароматические и галогенсодержащие углеводороды.

## **2.2. БИОТРАНСФОРМАЦИЯ КСЕНОБИОТИКОВ И ЗАГРЯЗНЯЮЩИХ ОКРУЖАЮЩУЮ СРЕДУ ВЕЩЕСТВ**

Чужеродные вещества (ксенобиотики), попадая в организм человека и животных, претерпевают различную биотрансформацию: окисление, восстановление, гидролиз, конъюгацию и другие процессы с участием ферментных систем.

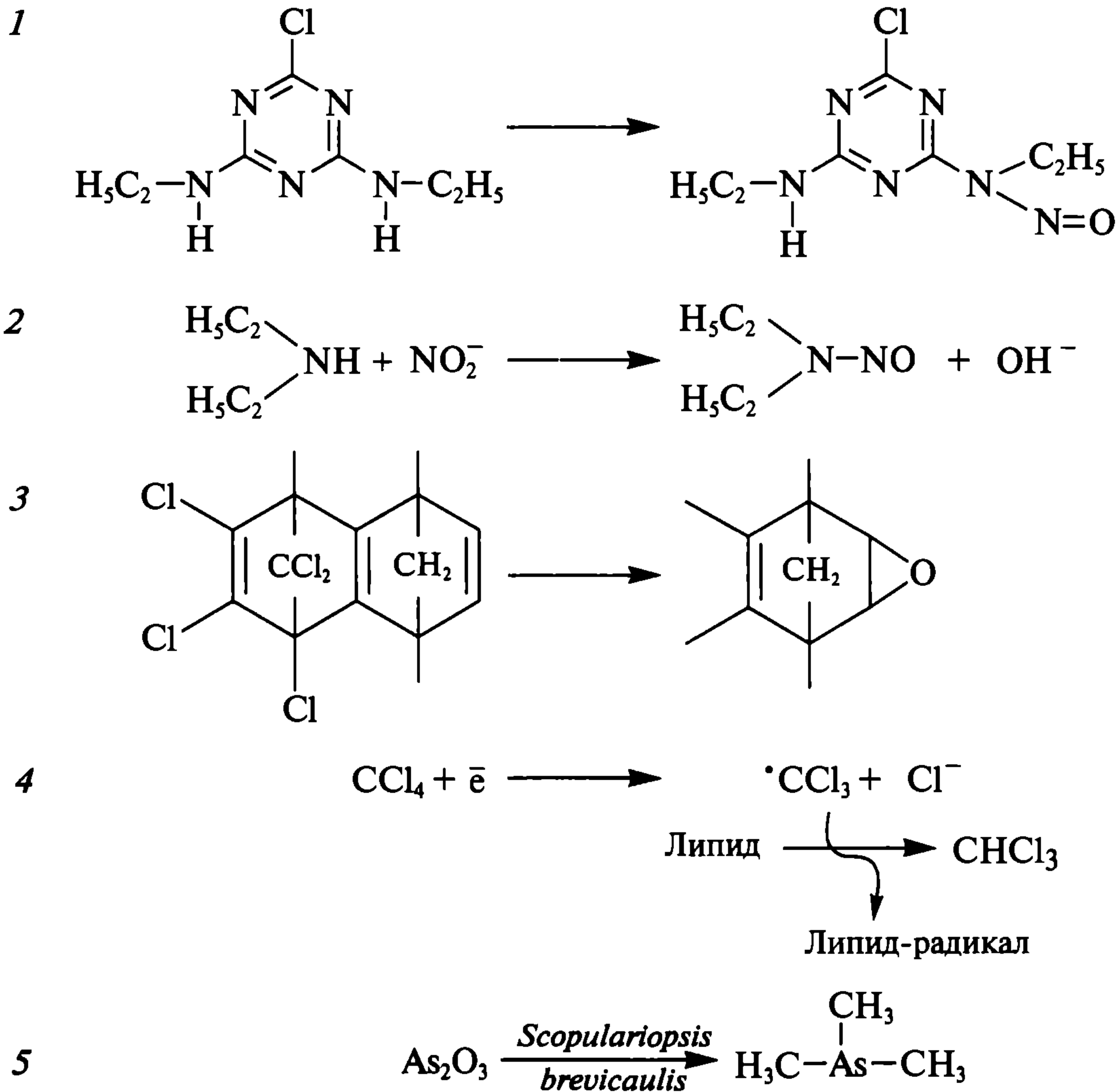


Рис. 2.1. Биотрансформация некоторых ксенобиотиков и загрязняющих веществ:

1 — окисление симазина с образованием канцерогена; 2 — окисление диэтиламина с образованием канцерогенного продукта в желудке млекопитающих; 3 — окисление (эпексидация) альдрина с образованием токсичного эпексидиальдрина (реакция протекает в организме позвоночных, а также осуществляется многими почвенными организмами из 8 родов); 4 — восстановление четыреххлористого углерода в печени с образованием промежуточного трихлорметильного радикала, способного вступать в реакции окисления и переводить другие молекулы в перекисные соединения, вызывающие повреждение печени; 5 — трансформация оксида мышьяка с образованием триметилированного производного мышьяка

Так, в реакциях окисления чужеродных веществ особое место занимают микросомальные монооксигеназы, а также комплексы мембранно-связанных ферментов с участием цитохромов Р-450. Биотрансформация чужеродных веществ под воздействием микроорганизмов и ферментов протекает в воде и почвах. Изучение этих реакций в почвах в немалой степени затруднено гетероген-



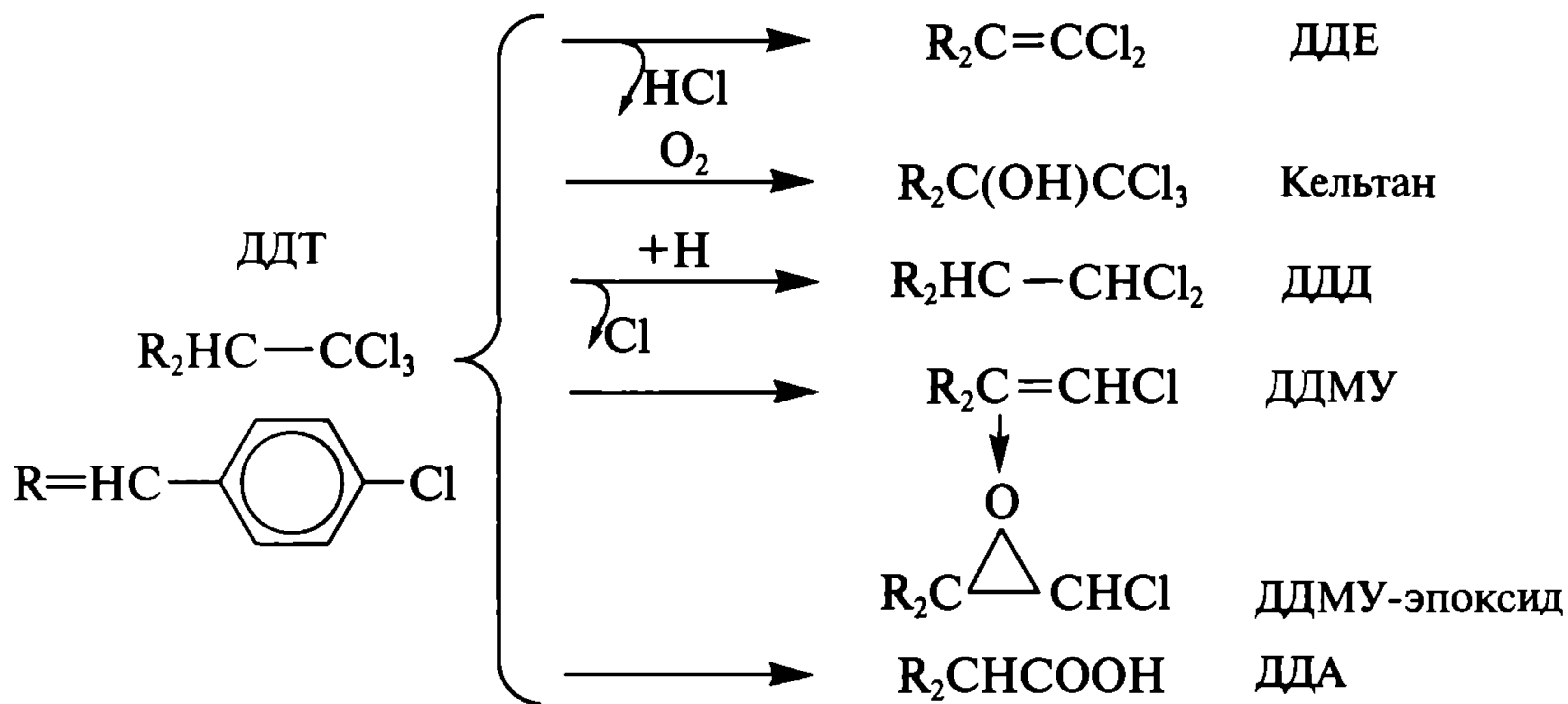


Рис. 2.2. Продукты биотрансформации ДДТ:

ДДЕ — канцероген для нескольких видов млекопитающих; ДДМУ — мутаген для сальмонелл; ДДА — производное ацетата; ДДМУ-эпоксид — продукт конденсации ДДА и ДДМУ, способный вызывать рак у мышей; ДДД — хлорированное восстановленное производное ДДМУ

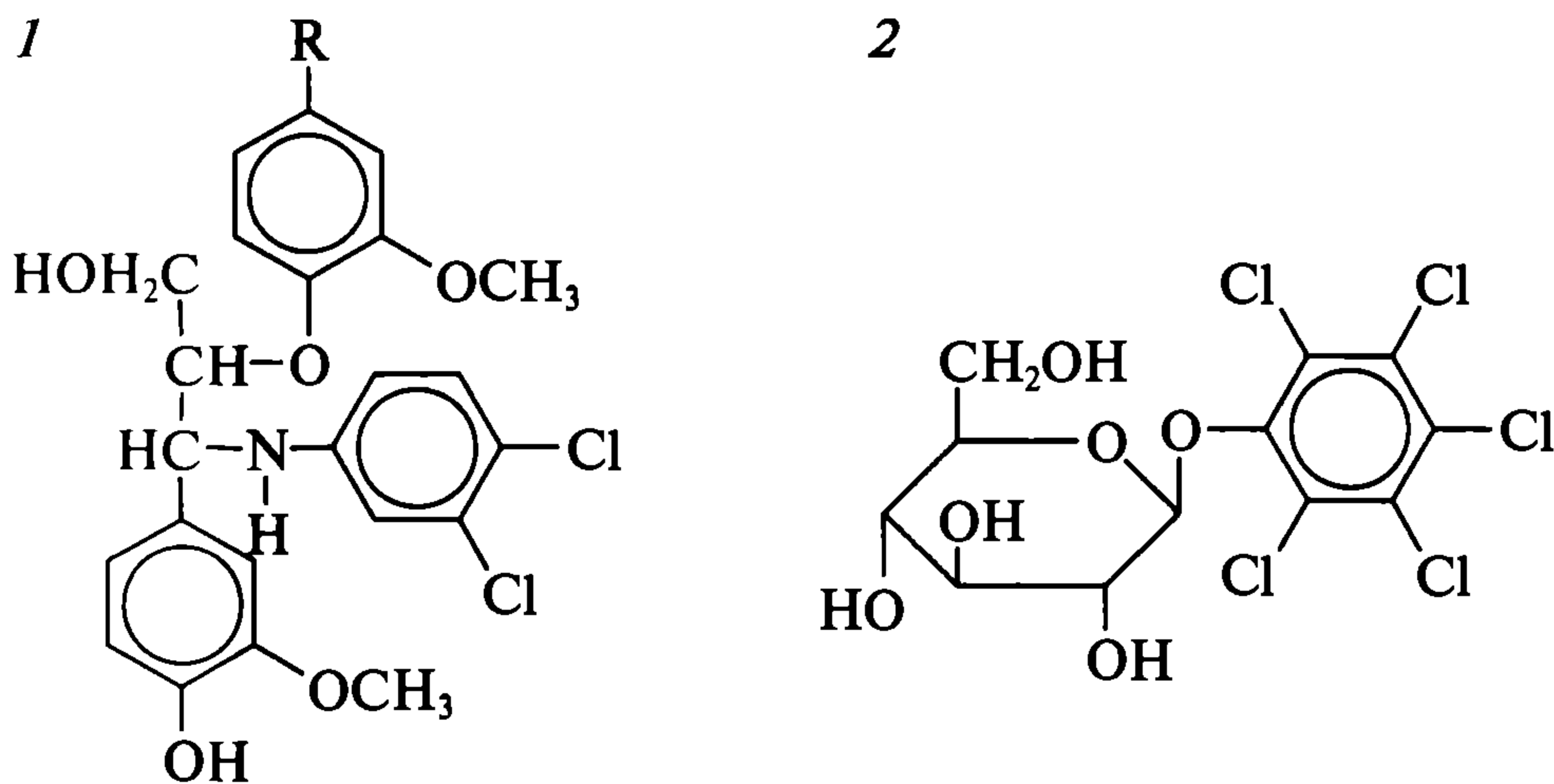


Рис. 2.3. Конъюгаты чужеродных веществ с биомолекулами растений:

1 — ковалентное связывание 3,4-дихлоранилина лигнином с образованием нерастворимого конъюгата; 2 — продукт конъюгации пентахлорфенола с глюкозой

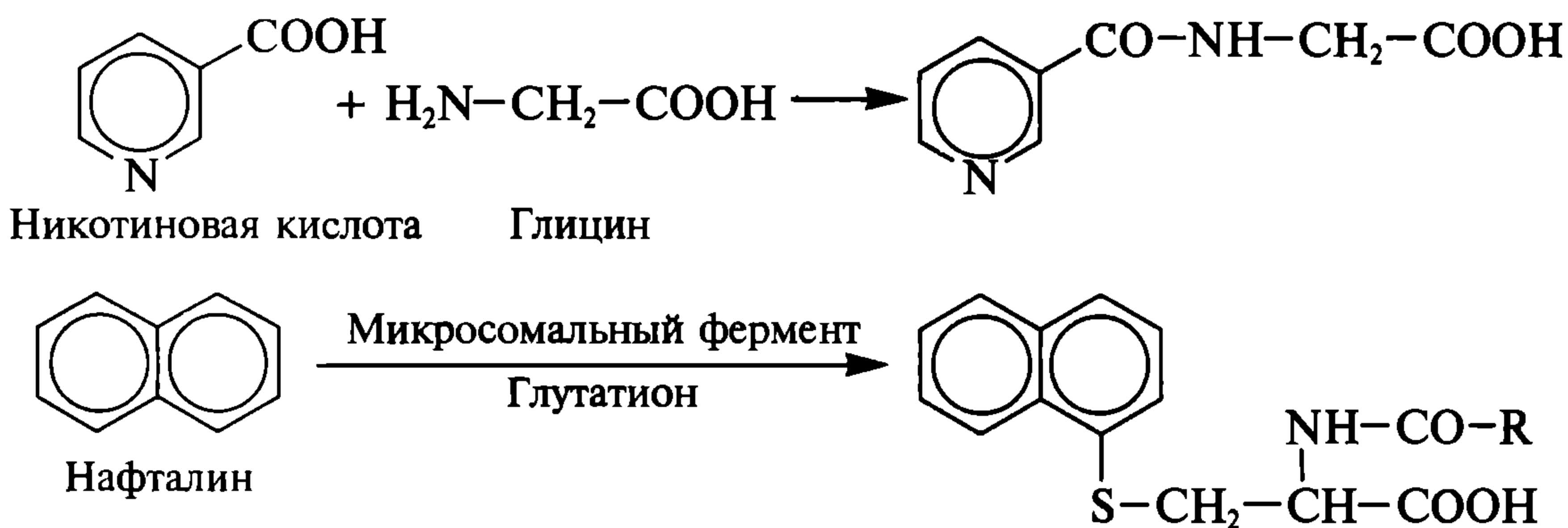


Рис. 2.4. Примеры конъюгации у животных



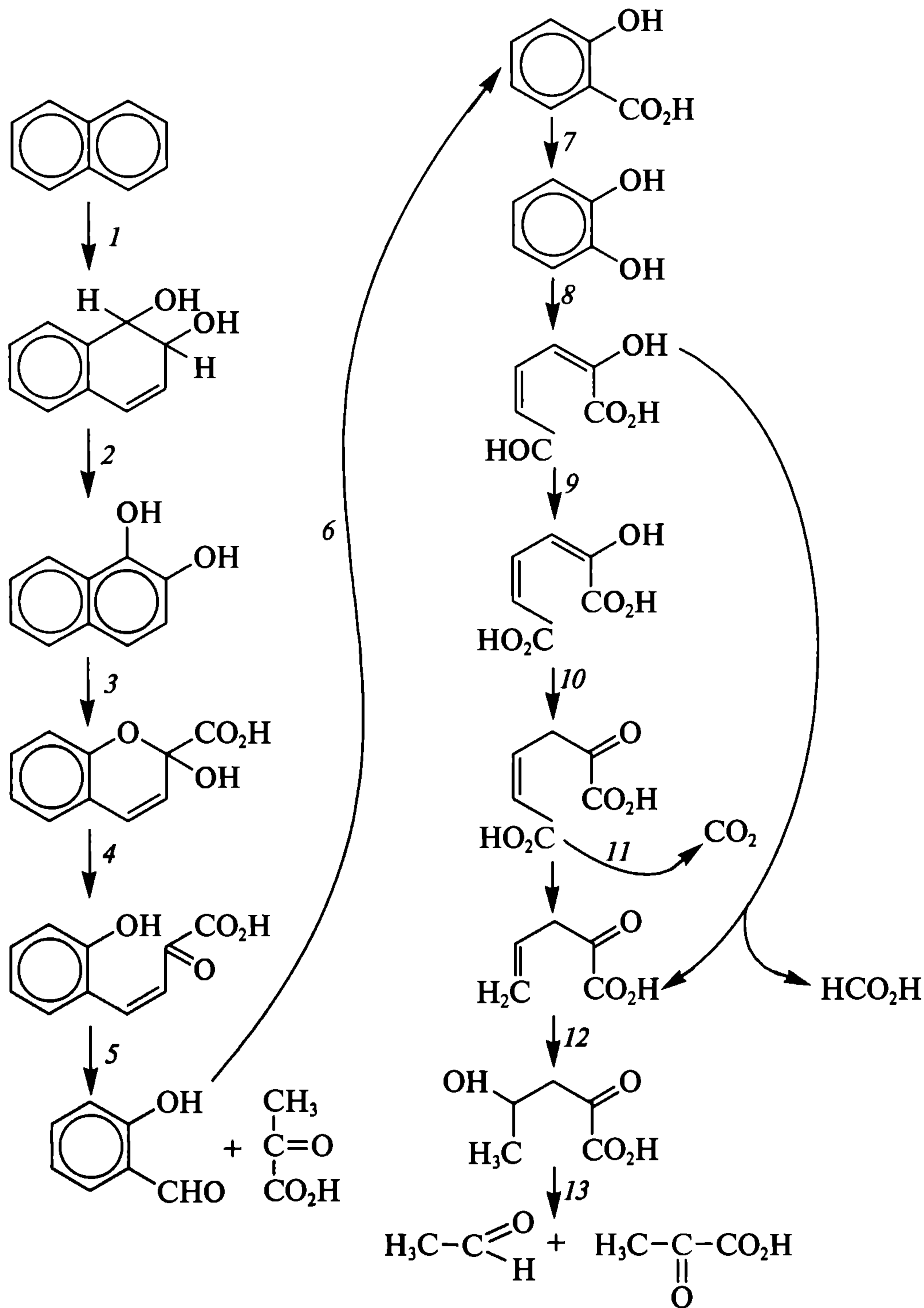


Рис. 2.5. Последовательность ферментативных реакций биodeградации нафталина:

1 — нафталиндиоксигеназа; 2 — *цис*-дигидродиолнафталиндегидрогеназа; 3 — 1,2-диоксинафталиндиоксигеназа; 4 — 2-оксихромен-2-2-карбоксилатизомераза; 5 — 2-оксибензальпируватальдолаза и пируват; 6 — салицилальдегиддегидрогеназа; 7 — салицилатгидроксилаза; 8 — катехолдиоксигеназа; 9 — 2-оксимуконатсемиальдегиддегидрогеназа; 10 — 2-оксимуконаттаутомераза; 11 — 4-оксалилкротонатдекарбоксилаза; 12 — 2-оксо-4-пентеноатгидратаза; 13 — 2-оксо-4-оксипентаноатальдолаза и пируват

ностью среды и адсорбцией ксенобиотиков, микроорганизмов и ферментов на частицах и коллоидах почв. Устойчивость многих ксенобиотиков в биосфере довольно высока. Например, ДДТ не исчезает из почвы до 30 лет, альдрин и хлордан — до 15 лет, диэльдрин — до 25 лет, гептахлор — до 14 лет. Некоторые поллютанты, подвергаясь распаду или трансформации, могут образовывать более устойчивые или токсичные продукты.

Процессы биотрансформации некоторых ксенобиотиков и загрязняющих веществ показаны на рис. 2.1 — 2.5.

Среди ксенобиотиков, вносимых человеком в биосферу, немалая часть относится к производным нафталина и салициловой кислоты. В превращении этих соединений участвует большое число ферментов.

## 2.3. ПОЛУЧЕНИЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИ ЧИСТОЙ ЭНЕРГИИ. БИОГАЗ

Экологически чистую энергию можно получать путем преобразования солнечной энергии в электрическую с помощью солнечных коллекторов, а также из *биогаза* и *микробного этанола*.

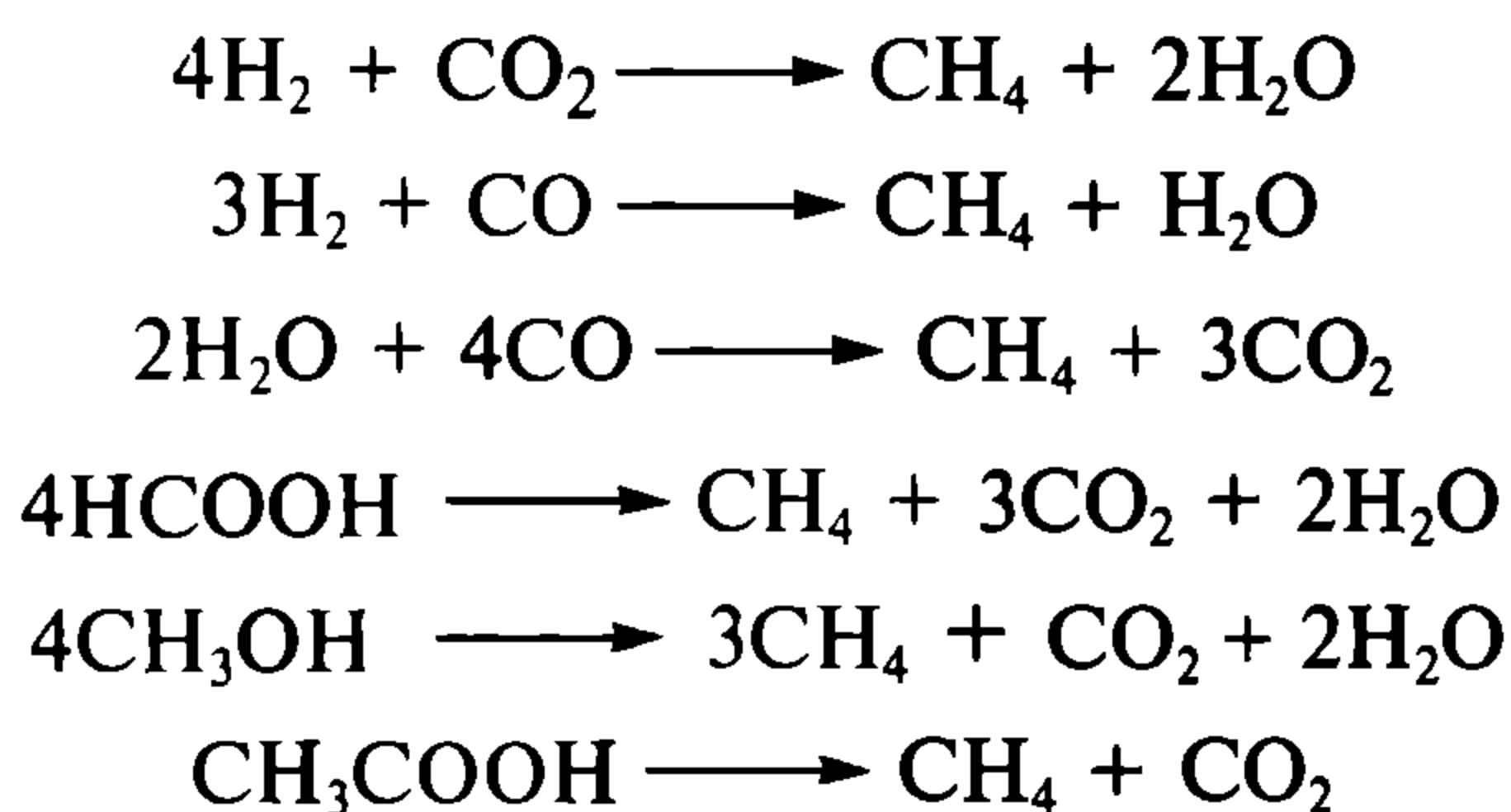
Биогаз — это смесь из 65 % метана, 30 %  $\text{CO}_2$ , 1 % сероводорода и незначительных примесей азота, кислорода, водорода и угарного газа. Энергия, заключенная в 28 м<sup>3</sup> биогаза, эквивалентна энергии: 16,8 м<sup>3</sup> природного газа; 20,8 л нефти; 18,4 л дизельного топлива. В основе получения биогаза лежит процесс метанового брожения, или биометаногенез — процесс превращения биомассы в энергию.

*Биометаногенез* — сложный микробиологический процесс, в котором органическое вещество разлагается до диоксида углерода и метана в аэробных условиях. Микробиологическому анаэробному разложению поддаются практически все соединения природного происхождения, а также значительная часть ксенобиотиков органической природы. В анаэробном процессе биометаногенеза выделяют три последовательные стадии, в которых участвуют свыше 190 различных микроорганизмов. На *первой стадии* под влиянием экстрацеллюлярных ферментов ферментативному гидролизу подвергаются сложные многоуглеродные соединения — белки, липиды и полисахариды. Вместе с гидролитическими бактериями функционируют и микроорганизмы — бродильщики, которые ферментируют моносахариды, органические кислоты.

На *второй стадии* (ацидогенез) в процессе ферментации участвуют две группы микроорганизмов: ацетогенные и гомоацетатные. Ацетогенные  $\text{H}_2$ -продуцирующие микроорганизмы фермен-

тируют моносахариды, спирты и органические кислоты с образованием  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$ , низших жирных кислот, в основном ацетата, спиртов и некоторых других низкомолекулярных соединений. Дегградация бутирата, пропионата, лактата с образованием ацетата происходит при совместном действии ацетогенных  $\text{H}_2$ -продуцирующих и  $\text{H}_2$ -утилизирующих бактерий. Гомоацетатные микроорганизмы усваивают  $\text{H}_2$  и  $\text{CO}_2$ , а также некоторые одноуглеродные соединения через стадию образования ацетил-КоА и превращения его в низкомолекулярные кислоты, в основном в ацетат.

На заключительной *третьей стадии* анаэробного разложения отходов образуется метан. Он может синтезироваться через стадию восстановления  $\text{CO}_2$  молекулярным водородом, а также из метильной группы ацетата. Некоторые метановые бактерии способны использовать в качестве субстрата формиат,  $\text{CO}_2$ , метанол, метиламин и ароматические соединения:



Особое место в утилизации отходов занимает метановое сбраживание. Оно позволяет получать из местного сырья биогаз как локальный источник энергии, а также улучшать качество органического удобрения и защищать окружающую среду от загрязнений. Экологически чистые источники энергии не влияют отрицательно на окружающую среду. Современные источники энергии — ГЭС, ТЭС, АЭС — вызывают серьезные нарушения во внешней среде. ГЭС (гидроэлектростанции) служат причиной затопления территорий, изменения ландшафта, гибели биоценозов. ТЭС (теплоэлектростанции) загрязняют атмосферу, нарушают альгологический баланс, вызывают отчуждение земель. АЭС (атомные электростанции) создают угрозу радиационного загрязнения. Сжигание нефти и газа вызывает повышение концентрации  $\text{CO}_2$ , образование смога и, кроме того, уменьшение ресурсов нефти и газа.

90 — 95 % используемого углерода метанообразующие бактерии превращают в метан и лишь 5 — 10 % углерода превращаются в биомассу. В литературе имеются данные о способности метанообразующих бактерий в анаэробных условиях одновременно синтезировать и окислять метан.

В зависимости от температуры протекания процесса метановые бактерии разделяют на мезо- и термофильные. Оптимальная

температура для мезофильных бактерий от 30 до 40 °С, а для термофильных от 50 до 60 °С. В целом термофильный процесс метаногенеза идет интенсивнее мезофильного, притом в этих условиях анаэробной переработки отходов субстрат обеззараживается от патогенной микрофлоры и гельминтов. При анаэробной переработке отходов животноводческих ферм микрофлора метантенков (анаэробных ферментеров) формируется преимущественно из микрофлоры желудочно-кишечного тракта данного вида животных и микрофлоры окружающей среды. Из наиболее часто встречающихся культур следует отметить *Lactobacillus acidophilus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Peptostreptococcus productus*, *Bacteroides uniformis*, *Eubacterium aerofaciens*. К числу целлюлозоразлагающих бактерий микрофлоры жвачных относятся *Bacteroides succinogenes* и *Ruminococcus flavefaciens*. Из рубца и навоза жвачных были изолированы такие метанообразующие бактерии, как *Methanobacterium mobile*, *Methanobrevibacter ruminantium* и *Methanosarcina* ssp. После определенного срока работы метантенка при установленном температурном режиме и на постоянном субстрате образуется сравнительно стабильный консорциум микроорганизмов. В ходе изучения микрофлоры свиного навоза при метановом брожении выделено около 130 различных бактерий.

Первую стадию разрушения сложных органических полимеров осуществляют бактерии из родов *Clostridium*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Butyrivibrio*. Главные продукты ферментации — ацетат, пропионат, сукцинат,  $H_2$  и  $CO_2$ . Конечными продуктами ферментации целлюлозы и гемицеллюлозы под действием бактерий, выделенных из рубца жвачных и кишечника свиней, являются различные летучие жирные кислоты.

Бактерии второй, или ацетогенной, фазы, относящиеся к родам *Syntrophobacter*, *Syntrophomonas* и *Desulfovibrio*, вызывают разложение пропионата, бутирата, лактата и пирувата до ацетата,  $H_2$  и  $CO_2$  — предшественников метана. Ряд микроорганизмов способны синтезировать ацетат из  $CO_2$  в термофильных условиях, к их числу принадлежат *Clostridium formicoaceticum*, *Acetobacterium woodii*, метановые бактерии из родов *Methanothrix*, *Methanosarcina*, *Methanococcus*, *Methanogenium* и *Methanospirillum*.

Для получения биогаза можно использовать отходы сельского хозяйства, испорченные продукты, стоки крахмалперерабатывающих предприятий, жидкие отходы сахарных заводов, бытовые отходы, сточные воды городов и спиртовых заводов. Процесс ведется при температуре 30 — 60 °С и рН 6 — 8. Этот способ получения биогаза широко применяют в Индии, Китае, Японии. В настоящее время для производства биогаза чаще используют вторичные отходы (отходы животноводства и сточные воды городов), чем

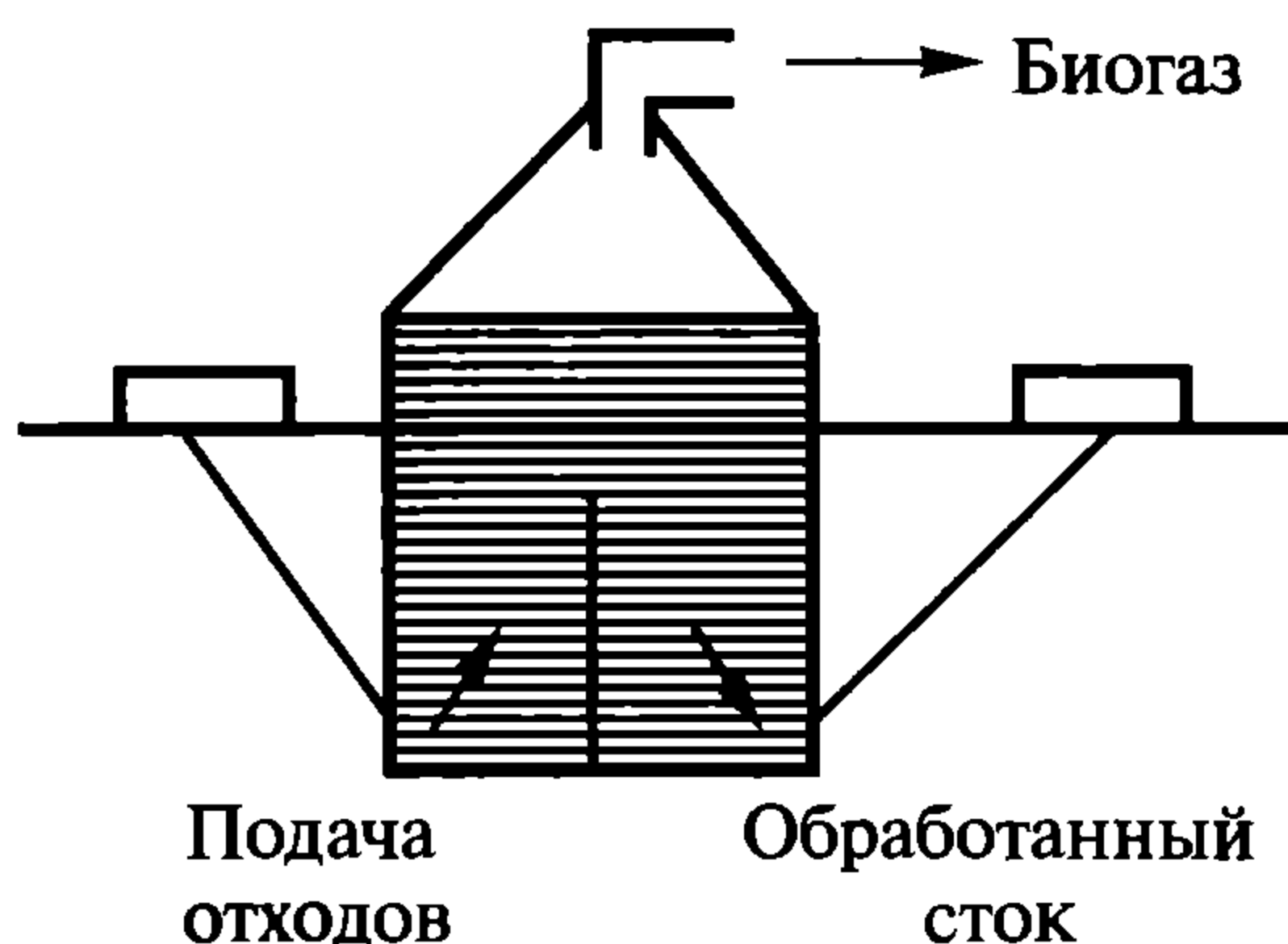


Рис. 2.6. Схема устройства реактора для обработки сельскохозяйственных отходов

первичные (отходы зерноводства, полеводства, хлопководства, пищевой, легкой, микробиологической, лесной и других отраслей), обладающие сравнительно низкой реакционной способностью и нуждающиеся в предварительной обработке. На рис. 2.6 представлена схема устройства реактора (метантенка) для обработки сельскохозяйственных отходов (навоз, остатки растениеводства). Подача отходов (субстрата) и отбор обработанного стока осуществляются

в нижней части реактора. Режим его работы может быть как периодическим, так и полунепрерывным. Реактор обычно имеет две (или более) секции для разделения стадий процесса.

Современное состояние проблем и перспектив в области получения биогаза свидетельствует о том, что анаэробная конверсия органических отходов в метан — наиболее конкурентоспособная область биоэнергетики. Основное преимущество биогаза состоит в том, что он является возобновляемым источником энергии. Его производство будет так же длительно, как существование жизни на Земле.

## 2.4. ПРОИЗВОДСТВО ЭТАНОЛА

Энергию можно получать из растений, богатых углеводами, превращая их в спирт (этанол). К ним относятся меласса, картофель, маниок, стебли кукурузы, злаки, топинамбур (земляная груша). Большое количество этанола получают из гидролизатов древесины лиственных пород или из сульфитных щелоков — отходов бумажных фабрик. Полученный спирт можно смешивать с бензином в соотношении 1:9 (или даже 1:4) и заправлять им машины.

Рост производства этанола связан с широтой его применения в химической промышленности. Он прекрасный растворитель, антифриз, экстрагент. Этанол служит также субстратом для синтеза многих растворителей, красителей, лекарственных препаратов, смазочных материалов, клеев, моющих средств, пластификаторов, взрывчатых веществ и смол для производства синтетических волокон. Его используют в двигателях внутреннего сгорания либо в безводном виде, либо в форме гидратированного этанола. Среди растений, продуцирующих этиловый спирт, следует выделить маниок, злаки (особенно кукурузу) и топинамбур, у которо-

го запасным углеводом является инулин. Используются также сахарный тростник, ананас, сахарная свекла, сорго, у которых основной углевод — сахароза. При переработке сахарного тростника его тщательно давят, целлюлозу (жом) отделяют от сладкого сока и сжигают, а сок концентрируют, стерилизуют и подвергают брожению. Этот раствор отделяют от твердых компонентов и далее из 8 — 10 %-го спиртового раствора путем перегонки получают этанол. Из оставшейся жидкости (стиллаж) после соответствующей переработки извлекают компоненты удобрений с выходом 2 — 3 %. «Барду» (кубовой остаток) после перегонки используют в качестве корма для сельскохозяйственных животных. Крахмал при его переработке сначала гидролизуют в сбраживаемые сахара. Производство этанола из мелассы с использованием жома сахарного тростника в качестве топлива выгодно при современных ценах на сырую нефть.

Данное производство должно быть строго скоординировано со структурой сельскохозяйственных систем и энергопотребляющих секторов хозяйств. Прекрасным сырьем для получения этанола является маниок, способный расти и в полупустынных районах; он может использоваться круглогодично. Из 1 т маниока удастся получить 80 л этанола, а из 1 т сахарного тростника — 60 — 65 л.

В США широко применяют смесь из 6 — 9 г бензина и 1 г этанола (газохол). В 28 штатах ею заправляют около 800 станций, но для замены всего бензина, потребляемого в США, газохолом потребуются ежегодно производить 45,6 млрд л этанола, что значительно превышает производимое количество спирта, в том числе из злаков.

Среди других технических культур наибольшее предпочтение отдают топинамбуру, который имеет много ботвы, способной компенсировать энергозатраты на перегонку спирта. Инулин, содержащийся в клубнях, после гидролиза и брожения может обеспечить 30 — 50 гл ацетонобутаноловой смеси с 1 га. Во Франции впервые осуществлена замена 10 % чистого бензина смесью метанола и ацетонобутанола. Перспективна также замена бензина этанолом, получаемым из отходов сахарной промышленности.

## **2.5. БИОТЕХНОЛОГИЯ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ СОЛНЕЧНОЙ ЭНЕРГИИ**

Все возрастающий дефицит ископаемых топливных ресурсов выдвигает на первый план острую проблему создания и внедрения *возобновляемых источников энергии* и сырья за счет биосистем: растений и фототрофных микроорганизмов, конвертирующих с высокой эффективностью солнечную энергию в энергию

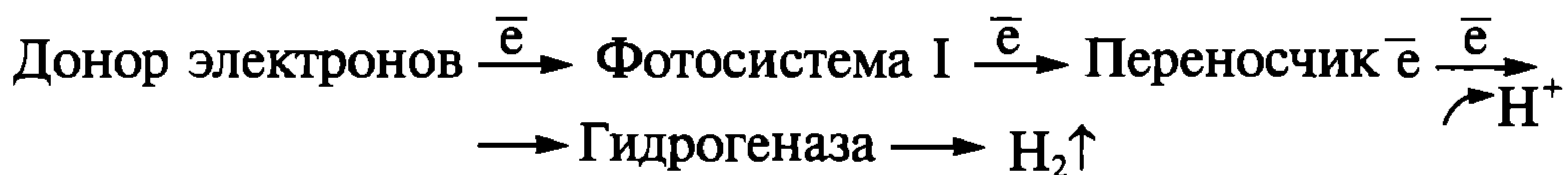
химических связей. Резервы солнечной энергии достаточно велики: на поверхность земного шара попадает около  $5 \cdot 10^{20}$  ккал этой энергии в год, что в 10 000 раз превосходит современный уровень мировой энергетики за счет добычи ископаемого топлива. Солнечная энергия способна обеспечить современный и будущий уровень энергозатрат человечества. Количество энергии, падающей на общую площадь пустынь на Земле ( $2 \cdot 10^7$  км<sup>2</sup>), достигает  $5 \cdot 10^{18}$  кВт · ч. Если бы удалось освоить эту энергию с КПД хотя бы 5 %, то уровень мировой энергетики возрастет более чем в 200 раз. Даже если будущее население Земли достигнет 10 млрд человек, то энергия, снятая с земной поверхности, в 10 — 12 раз будет превышать необходимые потребности. Ведутся исследования в направлении освоения солнечной энергии, падающей на поверхность морей и океанов.

Совершенно очевидно, что один из наиболее перспективных методов крупномасштабного преобразования солнечной энергии основан на использовании биосистем. Широкое применение биосистем для получения энергии способно обеспечить свыше 15 % производства энергии для экономически развитых стран. В последние 10 — 15 лет намечены новые пути биотрансформации солнечной энергии при *фотосинтезе*. Установлено, что некоторые микробиологические системы характеризуются высокой эффективностью фотосинтеза. Так, фоторазложение воды, осуществляемое суспензией хлореллы с образованием кислорода, в оптимальных условиях культивирования дает 130 — 140 л газа с 1 м<sup>2</sup> освещаемой поверхности в сутки. Известно, что одна из особенностей процесса фотосинтеза — уменьшение эффективности преобразования солнечной энергии при высоких значениях интенсивности света. Новые технологии позволяют повысить эффективность фотосинтеза при высокой интенсивности света. Разрабатываются системы, эффективно поглощающие световой поток и обогащенные реакционными центрами по отношению к пигменту. Световые кривые фотосинтеза улучшаются также с увеличением скорости лимитирующей стадии электронного транспорта. Например, проведение процесса при повышенных температурах в системах термофильных микроорганизмов увеличивает эффективность преобразования солнечной энергии при высокой интенсивности света.

## 2.6. ФОТОПРОИЗВОДСТВО ВОДОРОДА

Известно, что хлоропласты (например, из шпината) в присутствии искусственного донора электронов и бактериального экстракта, содержащего фермент гидрогеназу, способны продуцировать водород:





Гидрогеназа получает электроны от ферредоксина. В качестве доноров электронов используются различные органические соединения. Процесс сопровождается облучением видимым светом. Эта форма получения энергии имеет ряд достоинств: избыток субстрата фотолиза (воды); нелимитированный источник энергии (солнечный свет); не загрязняющий атмосферу водород. Водород обладает более высокой теплотворной способностью по сравнению с углеводородами, кроме того, процесс получения водорода — возобновляемый процесс, зависящий в основном от стабильности выделенных хлоропластов. Водород можно получать в присутствии искусственного донора  $\bar{e}$  (вместо воды) и поглощающих свет пигментов, а не мембран хлоропластов. Его способны выделять и некоторые микроорганизмы, например цианобактерии (аэробные фототрофы) и др. При этом микробиологическое образование водорода может идти из соединений углеводного характера, включая крахмал и целлюлозу, а также из аминокислот.

Основная проблема создания систем конверсии энергии биомассы в водород связана с превращением этих метаболитов в топливную форму. Для биотехнологии можно было бы воспользоваться и другими механизмами превращения энергии, выявленными у микроорганизмов. Например, галофильная бактерия *Halobacterium halobium* способна использовать световую энергию, улавливаемую пурпурным пигментом (*бактериородопсином*), вмонтированным в мембрану клетки. Молекула пигмента состоит из одной полипептидной цепи, к которой прикреплена молекула ретиналя, являющегося светочувствительной частью пигмента. Под влиянием солнечного света изменяется конформация пигмента, приводящая к переносу ионов водорода ( $\text{H}^+$ ) через мембрану. Пигмент является как бы протонным насосом. Молекулы бактериородопсина располагаются в мембране триадами, и перекачивание протонов через мембрану обеспечивает градиент концентрации  $\text{H}^+$  ( $\Delta\text{H}^+$ ), вследствие чего они движутся к наружной стенке, у которой пространство подкисляется и возникает электрохимический градиент ( $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ ).

Предприняты попытки встраивания молекул пигмента в искусственные системы и повышения эффективности их использования. В частности, растущие бактерии *H. halobium* переносят в мелкие водоемы с высокой концентрацией NaCl и других минеральных солей, в которых исключается загрязнение. У некоторых штаммов половина клеточной мембраны покрыта пурпурным пигментом, и из 10 л бактериальной культуры можно получить 0,5 г пурпурных мембран. В таких биомембранах содержится до



100 000 молекул родопсина. Биомембраны фиксируют на особой подложке, которая должна обладать всеми свойствами, необходимыми для обеспечения тока протонов, а не других ионов. В частности, для этих целей вполне пригодны пористые подложки, пропитанные липидами, которые, сливаясь с мембраной, сплошным слоем покрывают поверхность фильтра. Мембранные фрагменты можно смешивать и с акриламидом с образованием геля. Вместо создания плотных слоев молекул бактериородопсин и липиды могут создавать *протеолипосомы*, которые встраивают в структуры, обеспечивающие эффективное перекачивание протонов.

У *H. halobium* имеется и другой тип насоса, который обеспечивает галородопсин, использующий световую энергию непосредственно для перекачивания ионов. Изучение систем энергоконверсии чрезвычайно перспективно с точки зрения разработки искусственных устройств, более эффективных, чем естественные.

## 2.7. ОЧИСТКА СТОЧНЫХ ВОД

Важнейшая проблема экологической биотехнологии — очистка сточных вод. Потребность в воде в связи с ростом городов, бурным развитием промышленности, интенсификацией сельского хозяйства огромна. Ежегодный расход воды на земном шаре по всем видам водоснабжения составляет 3300 — 3500 км<sup>3</sup>, при этом в сельском хозяйстве — 70 % всего водопотребления. Для производств химической, целлюлозно-бумажной, энергетической промышленности, черной и цветной металлургии и бытовых нужд населения требуется также значительное количество воды. Большая часть этой воды после ее использования возвращается в реки и озера в виде сточных вод.

На современном этапе выделяются следующие направления рационального расхода водных ресурсов: более полное использование и расширение воспроизводства ресурсов пресных вод; разработка новых биотехнологических процессов, позволяющих предотвратить загрязнение водоемов и свести к минимуму потребление свежей воды.

Загрязнение поверхностных и подземных вод можно подразделить на несколько типов: механическое, сопровождающееся повышением содержания механических примесей и относящееся в основном к поверхностным видам загрязнений; химическое, обусловленное присутствием в воде органических и неорганических веществ токсического и нетоксического действия; биологическое, связанное с наличием в воде разнообразных патогенных микроорганизмов, грибов и мелких водорослей; радиоактивное; тепловое.

Основные источники загрязнения и засорения водоемов — недостаточно очищенные сточные воды промышленных и коммунальных предприятий, крупных животноводческих комплексов; отходы производства при разработке рудных ископаемых (воды шахт, рудников); сбросы водного и железнодорожного транспорта; пестициды и т. д. Загрязняющие вещества, попадая в природные водоемы, качественно изменяют их состав.

Сточные воды содовых, сульфатных, азотно-туковых заводов, обогатительных фабрик свинцовых, цинковых, никелевых руд, содержащие кислоты, щелочи, ионы тяжелых металлов, меняют физические свойства воды (появление неприятных запахов, привкусов и т. д.). Сточные воды нефтеперерабатывающих, нефтехимических заводов, предприятий органического синтеза содержат различные нефтепродукты, аммиак, альдегиды, смолы, фенолы и другие вредные вещества. Вследствие окислительных процессов уменьшается содержание в воде кислорода, ухудшаются ее органические показатели.

Нефть и нефтепродукты — основные загрязнители внутренних водоемов, вод и морей Мирового океана — создают разные формы загрязнения: плавающую на воде нефтяную пленку, осевшие на дно водоемов тяжелые фракции. Вода приобретает токсические свойства и представляет собой угрозу для всего живого: 12 г нефти делают непригодной для употребления 1 т воды. Вредным загрязнителем промышленных вод является фенол, содержащийся в сточных водах многих нефтехимических предприятий. На жизнь населения водоемов пагубно влияют сточные воды целлюлозно-бумажной промышленности. Окисление древесной массы сопровождается поглощением значительного количества кислорода, что приводит к гибели икры, мальков и взрослых рыб. Сточные воды, имеющие повышенную радиоактивность (100 кюри на 1 л и более), подлежат захоронению в подземные бессточные бассейны и специальные резервуары.

В значительной степени загрязняют водоемы моющие синтетические средства, широко используемые в быту, промышленности и сельском хозяйстве и парализующие жизнедеятельность бактерий. Пестициды, попадая в водоемы, накапливаются в планктоне, бентосе, рыбе и по цепочке питания попадают в организм человека, действуя отрицательно как на отдельные органы, так и на организм в целом. Сточные воды, содержащие отходы кожевенной и целлюлозно-бумажной промышленности, сахарных и пивоваренных заводов, предприятий мясомолочной, консервной и кондитерской промышленности, служат причиной органических загрязнений водоемов. Нагретые сточные воды тепловых электростанций вызывают тепловое загрязнение, которое резко изменяет термический режим, отрицательно влияет на флору и фауну водоемов. Возникают благоприятные условия для массового раз-

вития в водохранилищах синезеленых водорослей (так называемое «цветение воды»).

**Методы очистки сточных вод.** Применение того или иного метода (механического, химического, физико-химического и биологического) в каждом конкретном случае определяется характером и степенью вредности примесей.

1. *Механические методы.* Сущность этих методов состоит в том, что из сточных вод путем отстаивания и фильтрации удаляют механические примеси. Грубодисперсные частицы в зависимости от размеров улавливаются решетками, ситами, песколовками, навозоуловителями, нефтеловушками и т.д. Механическая очистка позволяет выделять из бытовых сточных вод до 60 — 75 % нерастворимых примесей, а из промышленных — до 95 %, многие из которых как ценные примеси используются в производстве.

2. *Химические методы.* В сточные воды добавляют различные химические реагенты, которые вступают в реакцию с загрязнителями и осаждают их в виде нерастворимых осадков. Химическая очистка уменьшает количество нерастворимых примесей до 95 %, а растворимых — до 25 %.

3. *Физико-химические методы.* Суть этих методов — удаление тонкодисперсных и растворенных неорганических примесей, разрушение органических и плохо окисляемых веществ. В арсенал методов входят электролиз, окисление, сорбция, экстракция, ионообменная хроматография, ультразвук, высокое давление и др.

4. *Биологические методы.* Данные методы основаны на использовании закономерностей биохимического и физиологического самоочищения рек и других водоемов. Для очистки сточных вод используют биофильтры, биологические пруды и аэротенки.

В биофильтрах сточные воды пропускают через слой крупнозернистого материала, покрытого тонкой бактериальной пленкой, благодаря которой интенсивно протекают процессы биологического окисления. В биологических прудах в очистке сточных вод принимают участие все организмы, населяющие водоем.

Аэротенки — огромные резервуары из железобетона, в которых очистка происходит с помощью активного ила из бактерий и микроскопических животных, которые бурно развиваются в этих сооружениях, чему способствуют органические вещества сточных вод и избыток кислорода, поступающего с потоком подаваемого воздуха. Бактерии, склеивающиеся в хлопья, выделяют в среду ферменты, разрушающие органические загрязнения. Ил с хлопьями оседает, отделяясь от очищенной воды. Инфузории, жгутиковые, амёбы, коловратки и другие мельчайшие животные, пожирая бактерии, не слипшиеся в хлопья, тем самым омолаживают бактериальную массу ила. Сточные воды сначала подвергают механической, а после химической очистке для удаления болезне-

творных бактерий путем хлорирования жидким хлором или хлорной известью. Для дезинфекции используют также ультразвук, озонирование, электролиз и другие методы.

Биологические методы дают существенные результаты при очистке коммунально-бытовых стоков, отходов предприятий нефтеперерабатывающей, целлюлозно-бумажной промышленности и производства искусственного волокна. Однако они разрушают только относительно простые органические и аммонийные соединения.

**Отстой сточных вод и его использование.** В зависимости от степени обработки отстой городских сточных вод обычно делят на *первичный* (необработанный) — твердые вещества; *вторичный* — твердые вещества, выделяющиеся после вторичного отстоя, или отстой с биофильтров очистных сооружений; *третичный* — результат третичного отстоя сточных вод (известь и глина); *отстой, перегнивший в анаэробных условиях*.

До осушки отстой содержит большое количество влаги (до 95 %). После некоторой стабилизации отстоя, которая достигается путем его сбраживания, содержание твердых веществ составляет 30 %.

Доля содержания органической части в городских сточных водах колеблется от 50 % в перегнившем отстое до 70 % в необработанном отстое. Химический состав типичных отстоев следующий: азот (N) — до 2 %; фосфор ( $P_2O_5$ ) — 4 %; калий — до 0,5 %. В небольших количествах обнаружены Cd, Cu, Ni, Zn, Hg и Pb. Энергосодержание необработанного отстоя составляет около 16 284 кДж/год. Однако практическое использование отстоя в качестве топлива связано с рядом трудностей: высокое содержание влаги не позволяет использовать отстой без высушивания, на которое расходуется фактически вся выделяемая в процессе его горения энергия. При очистке сточных вод применяют и метановое брожение, которое осуществляется в реакторах (метантенках) в основном двух типов: в реакторах без фиксации биомассы и в реакторах с прикрепленной (фиксированной) биомассой. В качестве подложки, к которой прикрепляется биомасса, используют мелкий песок, окись алюминия и другие носители.

В последнее время анаэробное метановое брожение применяют и для детоксикации стоков.

Анаэробные бактерии помимо деградации углеводов, липидов, белков, нуклеиновых кислот способны разрушать и многие отходы нефтехимической промышленности, например бензойную кислоту.

Адаптированные ассоциации анаэробов деградируют ацетальдегид, ацетон, бутанол, этилацетат, этилакрилат, глицерол, нитробензол, фенол, пропанол, пропиленгликоль, кротоновую, фумаровую и валериановую кислоты, винилацетат, парафины, синтетические полимеры и многие другие вещества.

# БИОТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА МЕТАБОЛИТОВ

Спектр продуктов, получаемых методами биотехнологии, необычайно широк и разнообразен. Целевыми продуктами биотехнологических производств могут быть интактные клетки. Одноклеточные организмы используют для получения биомассы, являющейся источником кормового белка. Клетки, особенно в иммобилизованном состоянии, выступают в роли биологических катализаторов для процессов биотрансформации.

*Процессами биотрансформации* называют реакции превращения исходных органических соединений (предшественников) в целевой продукт с помощью клеток живых организмов или ферментов, выделенных из них. В последние годы высокая специфичность процессов биотрансформации и эффективность иммобилизованных ферментов нашли широкое применение для крупномасштабного производства аминокислот, антибиотиков, стероидов и других промышленно важных продуктов.

Продуктами биотехнологических производств являются природные макромолекулы — белки, ферменты, полисахариды, полиэфир (поли- $\beta$ -гидроксибутират), выделенные из клеток микроорганизмов, тканей и органов растений и животных.

По отношению к процессу роста низкомолекулярные продукты метаболизма живых клеток делятся на первичные и вторичные

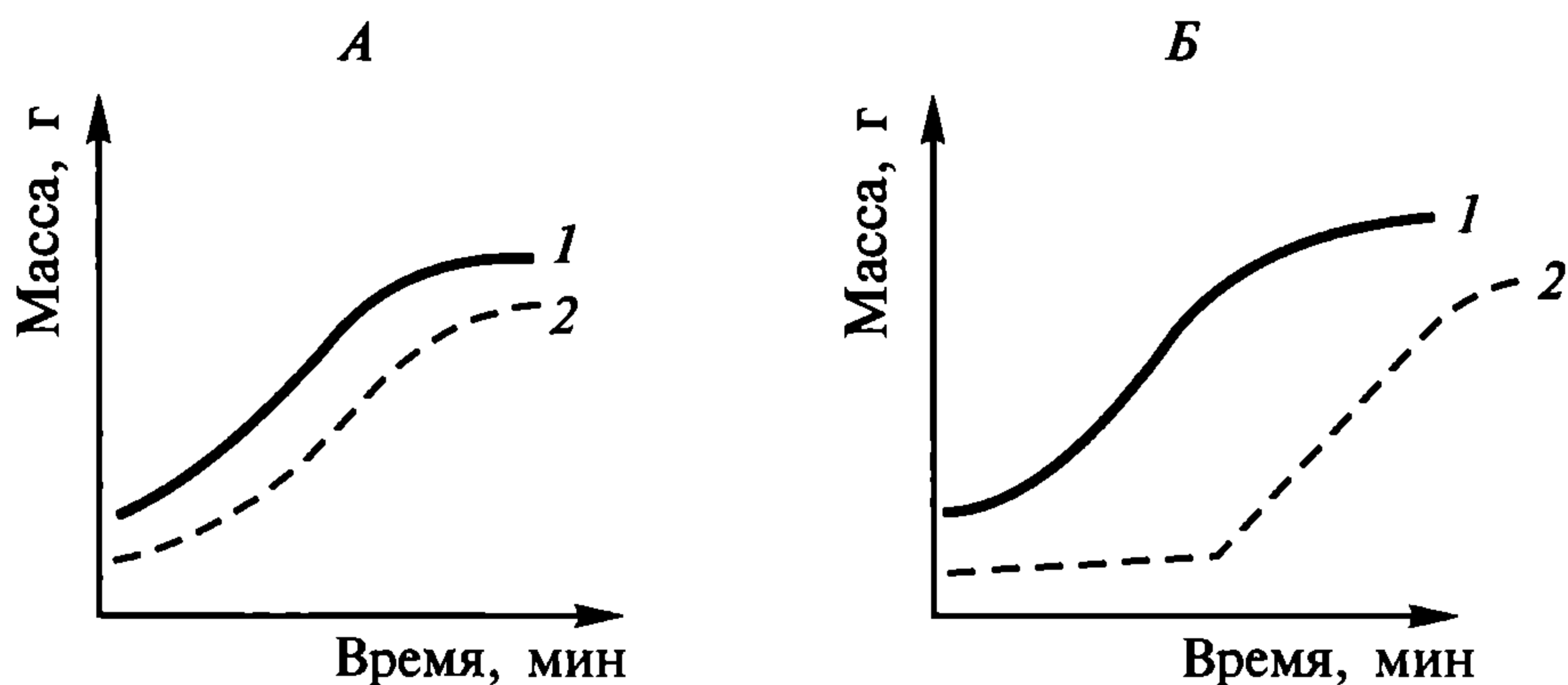


Рис. 3.1. Динамика изменения биомассы и образования первичных (А) и вторичных (Б) метаболитов в процессе роста организма:

1 — биомасса; 2 — продукт

метаболиты (рис. 3.1). Первичные метаболиты необходимы для роста клеток. К ним относятся структурные единицы биополимеров — аминокислоты, нуклеотиды, моносахариды, а также витамины, коферменты, органические кислоты и другие соединения. Вторичные метаболиты (антибиотики, пигменты, токсины) — низкомолекулярные соединения, не требующиеся для выживания клеток и образующиеся по завершении фазы их роста.

### 3.1. МЕХАНИЗМЫ ИНТЕНСИФИКАЦИИ ПРОЦЕССОВ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОДУКТОВ КЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА

Центральное звено биотехнологического процесса — живая клетка, в которой одномоментно синтезируется великое множество разнообразных соединений. В норме обмен веществ в клетке осуществляется по принципам строжайшей экономии, что обеспечивается сложнейшей системой регуляции обмена веществ. Задача биотехнолога состоит в обеспечении сверхсинтеза одного из продуктов метаболизма, что достигается как путем изменения генетической программы организма, так и посредством нарушения регуляторных систем метаболизма в нем.

Спонтанные изменения генетической природы организма — продуцента — основаны на процессах рекомбинации генетического материала *in vivo*. Для выделения из природных популяций высокопродуктивных штаммов микроорганизмов используют методы селекции, т. е. направленного отбора организмов со скачкообразным изменением геномов. Методы слепого многоступенчатого отбора случайных мутаций чрезвычайно длительны и могут занимать целые годы. Для возникновения мутаций интересующий ген должен удвоиться  $10^6$  —  $10^8$  раз. Более эффективен метод искусственного повреждения генома. Таким методом является *индуцированный мутагенез*, основанный на использовании мутагенного действия ряда химических соединений (гидроксиламин, нитрозамины, азотистая кислота, бромурацил, 2-аминопурин, алкилирующие агенты и др.), рентгеновских и ультрафиолетовых лучей. Мутагены вызывают замены и делеции оснований в составе ДНК, а также индуцируют мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания информации.

Методы классической селекции и рекомбинации, называемые в настоящее время *эволюционной инженерией* (G. N. Stefanopoulos et al., 1998), несмотря на их трудоемкость, не потеряли своего значения для создания высокоэффективных штаммов микроорганизмов — продуцентов. Они оказались перспективными для получения практически всех современных штаммов-продуцентов



антибиотиков и аминокислот и для оценки влияния на объекты различных факторов среды — ионов тяжелых металлов, кислот, щелочей и др. В 1983 г. С. Браун и С. Оливер использовали методы селекции для отбора мутантных штаммов дрожжей, устойчивых к высоким концентрациям конечного продукта (10 %-го этанола), при культивировании их в непрерывном режиме (650 ч). Многолетняя селекция штаммов-продуцентов пенициллина позволила увеличить удельную активность антибиотика в культуральной среде в 400 раз, а штаммов бактерий, синтезирующих кобаламин, — в 10 раз. Методами мутагенеза и селекции получены штаммы *Eremothecium ashbyii*, способные выделять до 1,8 мг рибофлавина в 1 мл среды, и штаммы *Brevibacterium ammoniegenes*, продуцирующие до 1 г HSKoA на 1 л среды. Большой вклад в развитие метода эволюционной инженерии внесли отечественные селекционеры, особенно ученые школы С. И. Алиханяна.

Достижения в области молекулярной биологии и молекулярной генетики позволили биотехнологам начиная с 70-х годов XX в. перейти от слепого отбора штаммов мутантов к сознательному конструированию геномов, используя для этой цели прогрессивную методологию генетической инженерии, которая позволяет выделить любой ген и интегрировать его в заданное положение бактериальной хромосомы через системы рекомбинации.

Большие возможности в отношении отбора нужных генов предоставляет обширная база секвенированных геномов, в которой на сегодняшний день находится более 200 полных нуклеотидных последовательностей микроорганизмов. Практически неисчерпаемым источником генов являются некультивируемые микроорганизмы, составляющие до 99% фонда микроорганизмов окружающей среды. В настоящее время разработаны методы получения препаратов ДНК микроорганизмов без их культивирования из разных объектов окружающей среды (почвы, пресной и соленой воды и др.). Такая ДНК, представляющая собой суммарный геном всех микроорганизмов данной экологической ниши, называется *метагеномом* (metagenome).

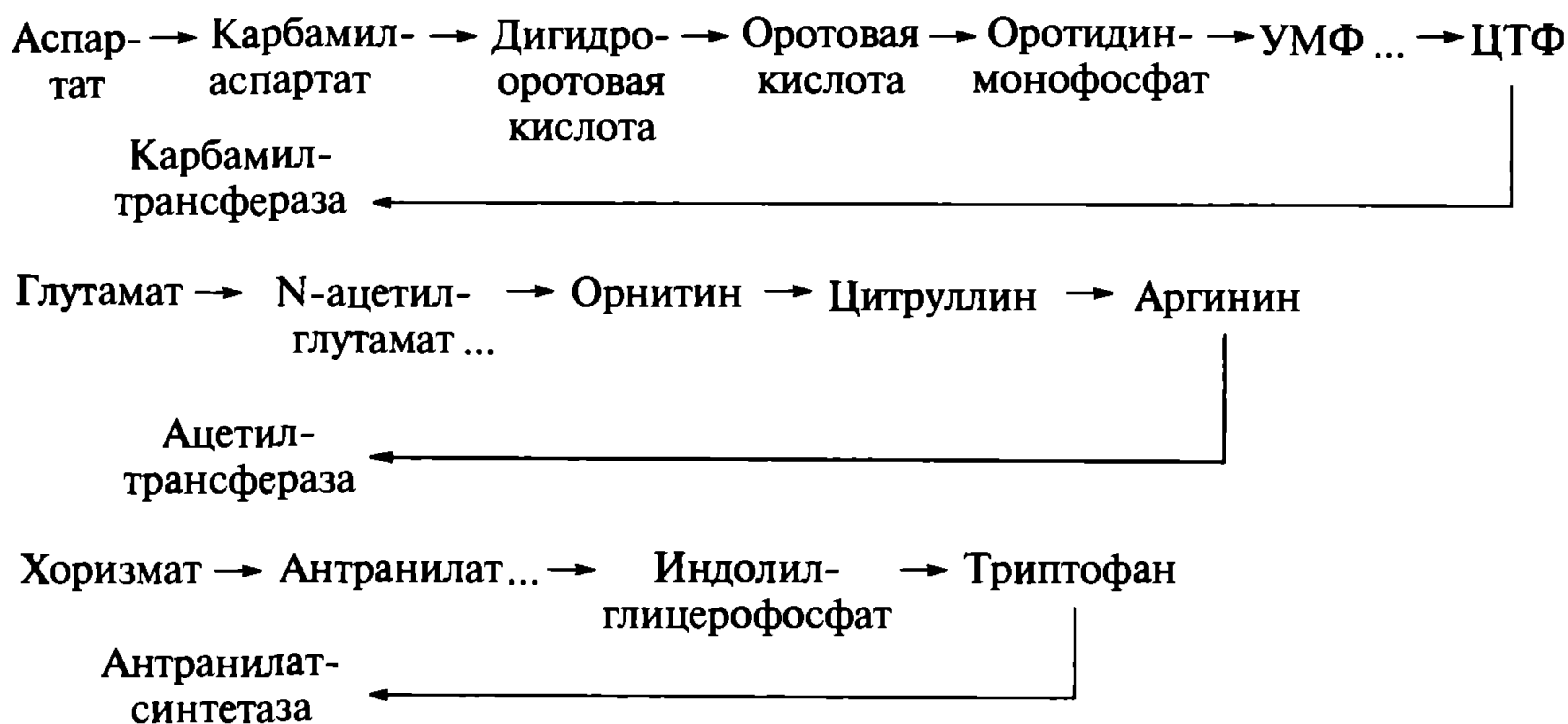
Обширными исследованиями, выполненными группой Дж. Вентера (J. C. Venter), была установлена последовательность нуклеотидов ДНК метагенома бактерий Саргассова моря. Выявлено 1 800 геномных видов, в том числе 148 до настоящего времени неизвестных фило типов бактерий. В итоге база данных Swiss Pot пополнилась 1 214 207 белковыми последовательностями микроорганизмов, т. е. увеличилась почти в 10 раз.

Для поиска мутаций, определяющих фенотип микроорганизмов, наряду с методами, базирующимися на создании библиотеки генов ДНК мутанта, в настоящее время применяются методы использования ДНК-микрочипов и тотального секвенирования

генов этого микроорганизма. Успехи селекции в значительной мере определяются уровнем автоматизации техники выявления биологической активности колоний. По сообщению вице-президента фирмы «Novozyme» (Дания), сотрудники компании способны тестировать сегодня до 10 000 энзимов в день против 1 — 2 ферментов в 1990 г. Однако интерпретация данных функционального скрининга, особенно метагенных библиотек, вызывает большие затруднения и нуждается в дальнейшем совершенствовании.

Фенотип клетки определяется динамическими процессами взаимодействия многих молекул. Каждое из множества разнообразных веществ создается в клетке в строго необходимых для роста пропорциях в результате ферментативных реакций. Координация химических превращений, обеспечивающая экономность метаболизма, осуществляется у микроорганизмов тремя основными механизмами: регуляцией активности ферментов, в том числе путем ретроингибирования; регуляцией объема синтеза ферментов (индукция и репрессия биосинтеза ферментов); катаболитной репрессией.

В процессе *ретроингибирования* (ингибирование по принципу обратной связи) активность фермента, стоящего в начале многоступенчатого превращения субстрата, тормозится конечным метаболитом, что детально разработано при изучении регуляции биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов и новообразования ряда аминокислот:



Таким способом низкомолекулярные метаболиты передают информацию об уровне своей концентрации и состоянии обмена веществ ключевым ферментам метаболизма. Ключевые ферменты — это регуляторы периодичности в процессе функционирования энзима и соответственно образования продукта. Эти ферменты представлены в клетке аллостерическими белками, а конечные метаболиты — аллостерическими эффекторами (активаторами и



## Аналоги конечных метаболитов

Конечный метаболит	Аналог
L-аргинин	D-аргинин
L-гистидин	L-тиазолаланин
L-лейцин	L-валин
L-триптофан	5-метилтриптофан

ингибиторами) ключевых энзимов. С помощью описанного механизма конечные продукты саморегулируют свой биосинтез. Ретроингибирование — способ точного и быстрого регулирования образования продукта.

На обмен веществ эффект, аналогичный конечным метаболитам, оказывают их аналоги (табл. 3.1). Указанное обстоятельство используется для селекции организмов с нарушением механизма обратной связи. Обход механизма ретроингибирования делает объект биотехнологического процесса нечувствительным к концентрации конечного продукта.

Для отбора объектов продуценты выращивают на селективной среде, содержащей подходящий аналог или антиметаболит, которые не включаются в обмен веществ (в частности, аналоги аминокислот не включаются в состав белков), что ведет к подавлению роста организма. Выжившие мутанты обладают дефектами в механизме регуляции активности фермента по принципу обратной связи и поэтому служат важными объектами в обеспечении сверхсинтеза целевого продукта.

Среди тысяч энзимов, присущих микроорганизмам, одни, например ферменты гликолиза, синтезируются постоянно, и их образование не зависит от состава питательной среды. Такие ферменты называют *конститутивными*. Другие энзимы, *адаптивные* или *индуцибельные*, возникают только в ответ на появление в питательной среде индукторов — субстратов или их структурных аналогов. Так, добавление  $\beta$ -галактозида — лактозы к питательной среде, на которой культивируются клетки кишечной палочки *E. coli*, вызывает мгновенное появление  $\beta$ -галактозидазы в них, биосинтез которой в последующий период времени возрастает в 10 000 раз. Установлено, что регуляция объема биосинтеза ферментов осуществляется на оперонном уровне (Ф. Жакоб и Ж. Моно, 1961) путем изменения количества иРНК, образующихся в процессе транскрипции.

Упорядоченная совокупность координированно экспрессирующихся генов, контролирующих родственные биохимические

функции, называется *опероном*. Координация экспрессии структурных генов в оперонах достигается одновременным включением или выключением транскрипции этих генов. Они транскрибируются с одного промотора (место присоединения РНК-полимеразы), находящегося на 5'-конце такой группы генов, в виде единственной молекулы полицистронной мРНК. На ней одновременно синтезируются все белки. К промотору примыкает регуляторный участок — оператор, к которому присоединяются белки-репрессоры и другие регуляторы транскрипции, что ведет к прекращению экспрессии всех генов. В процессе индукции низкомолекулярный метаболит-индуктор (например, лактоза), соединяясь с репрессорным белком (продукт гена-регулятора), инактивирует его и тем самым препятствует взаимодействию белка-репрессора с зоной оператора, что обеспечивает возможность присоединения к промотору РНК-полимеразы и начало синтеза иРНК.

Изучение механизма регуляции новообразования аминокислот у микроорганизмов показало, что конечные продукты метаболических путей не только ингибируют активность ферментов первых стадий процесса, но и тормозят биосинтез ферментов последних его этапов. Таким образом у микроорганизмов помимо аминокислот регулируется новообразование многих первичных метаболитов (пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, витаминов и других соединений). Обнаруженный феномен был назван *репрессией*, а ферменты, биосинтез которых стопорится под влиянием низкомолекулярных метаболитов, переводящих репрессорный белок в активную форму, способную оккупировать зону первоначального связывания РНК-полимеразы (промотор), называются *репрессибельными*. К их числу относятся глутаминсинтетаза, триптофансинтетаза, орнитинкарбамилтрансфераза, уреазы и ряд других энзимов. Специально поставленные опыты продемонстрировали, что репрессия биосинтеза ферментов обеспечивает более грубую в сравнении с ретроингибированием регуляцию образования анаболических энзимов.

Если концентрация конечного продукта уменьшается до определенного очень низкого уровня, то происходит дерепрессия фермента, т. е. скорость их биосинтеза возрастает до необходимых величин.

Бактериальные клетки продуцируют множество низкомолекулярных эффекторов в ответ на изменение окружающей среды (стресс, голодание, действие фагов и пр.). Каждый из эффекторов, взаимодействуя по аллостерическому механизму с определенными регуляторными белками, моделирует промоторную специфичность РНК-полимеразы, запуская тем самым экспрессию определенного набора генов.

Таким образом, ведущими механизмами, обеспечивающими экономность образования продуктов в клетках микроорганизмов,

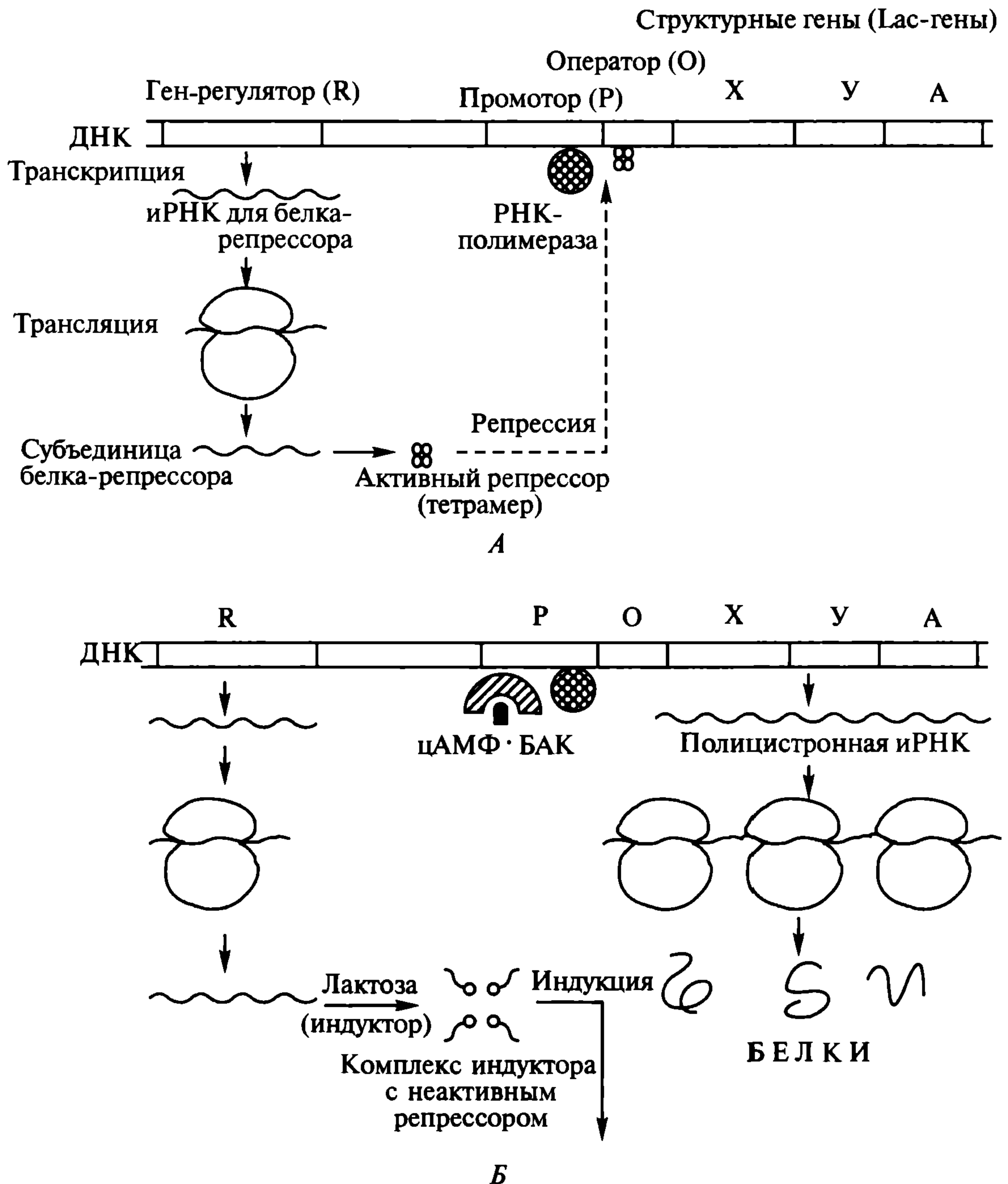


Рис. 3.2. Структура и механизм индукции и репрессии *lac*-оперона (пояснения см. в тексте):

*А* — в отсутствие индуктора; *Б* — в присутствии индуктора и при дефиците глюкозы

являются ретроингибирование и репрессия, базирующиеся на принципе обратной связи.

Если в питательной среде присутствуют несколько различных источников углерода, клетка микроорганизма вырабатывает ферменты для усвоения лишь одного, наиболее предпочтительного субстрата. Так, когда клетки выращивают на смеси глюкозы и лактозы, утилизируется в первую очередь глюкоза. После полного исчерпания глюкозы происходит экспрессия ферментов метаболизма

лактозы (экспрессия структурных генов лактозного оперона). Это явление получило название *катаболитной репрессии*, так как ранее полагали, что причина его состоит в подавлении биосинтеза ферментов обмена лактозы продуктами катаболизма глюкозы.

Следовательно, сущность катаболитной репрессии заключается в подавлении биосинтеза ферментов, обеспечивающих метаболизм одного источника углерода другим источником углерода.

Лактозный оперон (lac-оперон) включает структурные гены трех ферментов: X, Y и A (отвечают за взаимозависимый синтез  $\beta$ -галактозидазы, галактозилпермеазы и ацетилтрансферазы), контролирующих метаболизм лактозы в клетке (рис. 3.2). Экспрессия ферментов регулируется белком-репрессором — продуктом гена-регулятора (R), пространственно удаленного от гена-оператора (O). Субъединицы репрессора ( $38\text{ кДа} \times 4$ ) возникают с постоянной скоростью. Репрессор обладает высоким сродством к соответствующему оператору ( $K \approx 10^{-12}$  моль/л). Именно белок-репрессор, будучи присоединен к гену-оператору, препятствует транскрипции структурных генов X, Y и A.

Установлено, что катаболитная репрессия опосредуется действием специального белка-активатора катаболитных генов (БАК). Об отсутствии глюкозы в среде сигнализирует цАМФ. Лишь при дефиците глюкозы формируется комплекс цАМФ и БАК, абсолютно необходимый для связывания РНК-полимеразы с зоной промотора и начала транскрипции генов. В присутствии глюкозы концентрация цАМФ недостаточна для образования комплекса. Уровень цАМФ в клетке является функцией активности аденилатциклазы, синтез которой подавляется в присутствии глюкозы:



### **3.2. МЕТОДОЛОГИЯ СЕЛЕКЦИИ МУТАНТОВ С ДЕФЕКТАМИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ И РЕГУЛЯЦИИ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ**

Уровень экспрессии структурных генов в той или иной степени может быть изменен в результате мутаций, осуществляемых по различным участкам оперона. Целенаправленная селекция перспективных мутантов для создания высокопродуктивных организмов — важнейшая задача биотехнологии, ибо лишь дефекты регуляции обмена веществ обеспечивают синтез целевых продуктов метаболизма.

Так, мутации по участкам цистрона, детерминирующим структуру аллостерического центра фермента, могут привести к изме-

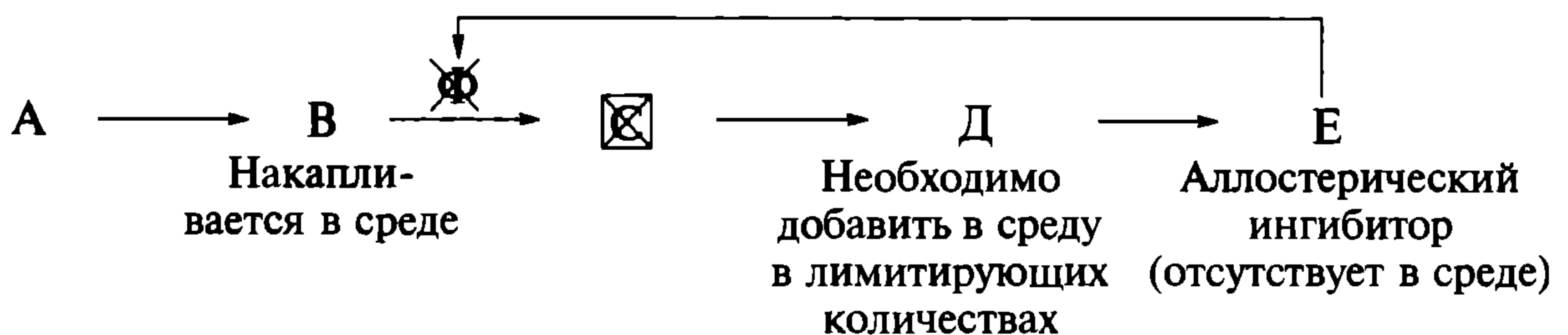
нениям в конформации белка, которые делают молекулу энзима нечувствительной к концентрации конечного продукта. Это обеспечивает возможность образования в клетке избыточного количества целевого продукта.

Мутации в гене-регуляторе проводят таким образом, чтобы его продукт — белок-репрессор — утрачивал способность связываться либо с индуктором, либо с оператором. В результате мутаций исчезает эффект катаболитной экспрессии, а индуцибельные ферменты становятся конститутивными, т. е. их экспрессия не зависит от присутствия в среде субстрата. Мутантные организмы, у которых изменены нуклеотидные последовательности в зоне гена-оператора, не могут связывать нормальный репрессор и также приобретают способность к конститутивной экспрессии структурных генов.

Мутанты с дефектами регуляторной области оперона называются *регуляторными*, их функция — биосинтез конститутивных ферментов.

Выключение механизма ретроингибирования возможно, если мутации у микроорганизмов вызывают дефект (разрыв) в последовательности биохимических реакций образования конечного продукта. Из-за отсутствия или выключения фермента (Ф), катализирующего промежуточную стадию процесса, в среде накапливается не конечный продукт, а промежуточный целевой метаболит.

Мутанты с ограниченной способностью к образованию конечных продуктов называются *ауксотрофными*. Благодаря отсутствию ингибитора (конечного продукта) использование субстрата и рост микроорганизма продолжают, но лишь при условии добавления в среду в лимитирующих количествах вещества — продукта блокированной реакции:



На практике высокопродуктивные организмы часто обладают двумя видами мутаций и являются ауксотрофно-регуляторными мутантами.

Для отбора мутантов с дефектами экспрессии генов и регуляции обмена веществ используют эффективные методы селекции. Один из них состоит в получении мутантов, устойчивых к структурным аналогам целевого продукта (см. с. 36). В основе другого метода лежит выделение ревертантов из ауксотрофных мутан-

тов. У таких мутантов восстановлена способность к синтезу конечного продукта, однако механизм ретроингибирования у них не функционирует вследствие изменения пространственной структуры ключевого фермента. Современные методы введения в состав ДНК сайт-специфичных мутаций рассмотрены в гл. 6.

Впрочем, генно-инженерные подходы конструирования штаммов микроорганизмов — продуцентов первичных и вторичных метаболитов — не столь просты, а их результаты не так впечатляющи. Это объясняется большим количеством ферментов, обычно участвующих в биосинтезе метаболитов, и сложнейшими и не до конца расшифрованными механизмами регуляции их активности, формирующими метаболические сети. Фенотип клетки определяется динамическими процессами взаимодействия молекул. В настоящее время разрабатываются подходы учета динамики метаболических потоков, что представляет собой важнейшую часть современной стратегии создания промышленных штаммов микроорганизмов, получившую название *«метаболическая инженерия»*.

Метаболическая инженерия — многоступенчатый циклический процесс, включающий стадии анализа, интерпретации аналитических данных и стадии генетического конструирования (В. Г. Дебабов, 2005). Таким образом, основой для метаболического конструирования штаммов микроорганизмов являются как результаты генетического анализа штаммов методами классической селекции, так и детальные биохимические данные о метаболических путях, структуре и свойствах ферментов и механизмах регуляции их активности (карты метаболических путей, электронные базы данных).

Знание механизмов регуляции обмена веществ в клетке необходимо для сознательного управления процессами биосинтеза целевых продуктов и создания организмов-сверхпродуцентов. В последующих разделах эти положения проиллюстрированы на примере технологии получения конкретных соединений.

### **3.3. БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПЕРВИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ**

#### **3.3.1. Производство аминокислот**

Среди соединений, получаемых биотехнологическими методами, аминокислоты занимают первое место по объему производства и второе место по стоимости, уступая по последнему параметру лишь антибиотикам. Объем мирового производства аминокислот составляет 800 тыс. т в год стоимостью более 5 млрд долларов.

Больше половины общего объема производства приходится на долю L-глутаминовой кислоты, которую используют для получения широко известного усилителя вкуса и аромата — глутамата натрия. Однако указанный объем — лишь небольшая доля от требуемого количества аминокислот. По данным ВОЗ, потребность человека всего лишь в четырех незаменимых аминокислотах составляет, млн т: лизин — 5, метионин — 4, треонин — 3,7 и триптофан — 2.

Аминокислоты — структурные единицы белков. Природные аминокислоты вовлечены в биосинтез ферментов, ряда гормонов, витаминов, антибиотиков, алкалоидов, токсинов и других азотсодержащих соединений (пурины, пиримидины, гем и пр.). В организме животного практически половина белковых аминокислот не синтезируется. Они называются *незаменимыми аминокислотами* и должны поступать в организм с пищей. Недостаток каждой из этих аминокислот в пищевом или кормовом рационе приводит к нарушению обмена веществ, замедлению роста и развития. Сведения о ежедневной потребности человека в незаменимых аминокислотах представлены в табл. 3.2.

Пищевая ценность белка определяется сравнением доли незаменимых аминокислот в пище с этим же показателем при адекватном питании. Чем ближе обе величины, тем выше качество белка. Белки яйца и молока обладают высокой пищевой ценностью и используются в качестве эталона при оценке других белков. Многие белки растительного происхождения характеризуются дефицитом некоторых незаменимых аминокислот. Так, белки пшеницы и риса обеднены лизином и треонином, а белки кукурузы — лизином и триптофаном.

Таблица 3.2

**Потребность человека в незаменимых аминокислотах**  
(мг/кг массы тела в сутки)

Аминокислота	Младенцы	Взрослые
Валин	92	14
Гистидин	33	10
Изолейцин	83	12
Лейцин	135	16
Лизин	99	12
Метионин (и цистеин)	49	10
Фенилаланин (и тирозин)	141	16
Треонин	68	8
Триптофан	21	3

**Потребность ряда сельскохозяйственных животных  
в незаменимых аминокислотах  
(% к сырому протеину)**

Аминокислота	Свиноматки	Куры-несушки	Коровы
Лизин	5,0	5,0	4,5
Метионин	3,2	3,6	1,7
Триптофан	1,2	1,2	—
Треонин	6,0	4,0	3,4

Введение синтетических незаменимых аминокислот в кормовые концентраты позволяет сбалансировать корма сельскохозяйственных животных по уровню белка. При добавлении 2—4 дефицитных аминокислот к 1 т комбикорма общий расход кормов уменьшается на 15—20 %, выход продукции увеличивается на 20 %. Добавление к кормам аминокислот способствует переводу животноводства на промышленную основу. Данные о потребности некоторых сельскохозяйственных животных в незаменимых аминокислотах приведены в табл. 3.3.

Помимо применения в качестве пищевых добавок, приправ и усилителей вкуса аминокислоты используют как сырье в химической, парфюмерной и фармацевтической промышленности и при производстве ряда других веществ:

- глицин — подсластитель, антиоксидант, бактериостатик;
- аспарагиновая кислота — усилитель вкуса, сырье для синтеза аспартама;
- глутаминовая кислота — усилитель вкуса, препарат для лечения психических заболеваний;
- гистидин — противовоспалительное средство;
- метионин — пищевая и кормовая добавки;
- цистеин — фармацевтический препарат;
- треонин и триптофан — пищевые и кормовые добавки;
- фенилаланин — сырье для получения аспартама;
- лизин — пищевая и кормовая добавки, сырье для получения искусственных волокон и пленок.

В промышленных масштабах белковые аминокислоты получают:

- 1) гидролизом природного белоксодержащего сырья;
- 2) химическим синтезом;
- 3) микробиологическим синтезом;
- 4) биотрансформацией предшественников аминокислот с помощью микроорганизмов или выделенных из них ферментов (химико-микробиологический метод).



При **гидролизе** белоксодержащее сырье (отходы пищевой и молочной промышленности) нагревают с растворами кислот или щелочей при температуре 100—105 °С в течение 20—48 ч. Чаще всего используют 20 %-й раствор соляной кислоты, обеспечивающий глубокий гидролиз белка. Кроме того, для ускорения реакции гидролиза белков используют иммобилизованные протеолитические ферменты и ионообменные смолы. В ходе кислотного гидролиза белков происходят рацемизация и разрушение некоторых составляющих их аминокислот. При кислотном гидролизе полностью разрушается триптофан и достаточно значительны потери цистеина, метионина и тирозина (10—30 %). Лучшим способом уменьшения потерь аминокислот при гидролизе являются проведение его в вакууме или в атмосфере инертного газа, а также соблюдение высокого соотношения количества кислоты, взятой для гидролиза, и массы белка (200:1). Рациональное использование сырья при гидролизе, характерное для многих других биотехнологических производств, обеспечивает создание безотходных технологий и способствует оздоровлению окружающей среды. Ранее методом гидролиза получали аминокислоты исключительно для фармацевтических и научных целей. В последнее время сфера использования белковых гидролизатов существенно расширилась. Их применяют в медицине, животноводстве, пищевой и микробиологической промышленности.

Существенный недостаток методов **химического синтеза** аминокислот состоит в получении целевых препаратов в виде рацемической смеси D- и L-стереоизомерных форм. Подавляющее большинство природных аминокислот относится к L-ряду. D-α-аминокислоты обнаружены лишь в составе гликопротеинов клеточных стенок бактерий, антибиотиков и некоторых токсинов. Проницаемость L-аминокислот в клетке в 500 раз превышает таковую ее антипода. Стереоспецифичны также транспорт и метаболизм аминокислот. Исключением в этом отношении является лишь метионин, метаболизм которого нестереоизбирателен, благодаря чему данная аминокислота получается преимущественно путем химического синтеза. Разделение рацематов других аминокислот — дорогая и чрезвычайно трудоемкая процедура.

Наиболее перспективен и экономически выгоден **микробиологический синтез** аминокислот. Более 60 % всех производимых в настоящее время промышленностью высокоочищенных препаратов белковых аминокислот получают именно этим способом, главное преимущество которого в сравнении с методами химического синтеза состоит в возможности получения L-аминокислот на основе возобновляемого сырья.

В последние годы при производстве аминокислот все шире используют биотрансформацию предшественников аминокислот, особенно с помощью иммобилизованных ферментов или

клеток микроорганизмов, предварительно получаемых химическим путем.

Промышленное производство аминокислот стало возможным после открытия способности у некоторых микроорганизмов выделять в культуральную среду значительные количества какой-либо одной аминокислоты (С. Киносита, 1955). При этом было замечено, что большинство из нескольких тысяч проанализированных диких штаммов микроорганизмов продуцировали аминокислоты во внешнюю среду, но в очень незначительных количествах. Не зафиксировано никакой связи между таксономическим положением микроорганизма и способностью к продуцированию той или иной аминокислоты. Так, среди возможных продуцентов глутаминовой кислоты отмечены организмы, из которых 30 % — дрожжи, 30 % — стрептомицеты, 20 % — бак-

Таблица 3.4

**Микроорганизмы — продуценты аминокислот**  
(по Н. Б. Градовой и О. А. Решетник, 1987)

Аминокислота	Микроорганизмы
Аргинин	<i>E. coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Corynebacterium glutamicum</i> , <i>Brevibacterium flavum</i> , <i>Serratia marcescens</i>
Гистидин	<i>B. flavum</i> , <i>C. glutamicum</i> , <i>S. marcescens</i> , виды <i>Streptomyces</i>
Изолейцин	<i>B. flavum</i> , <i>C. glutamicum</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. marcescens</i>
Лейцин	<i>Brevibacterium lactofermentum</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>C. glutamicum</i>
Лизин	<i>B. flavum</i> , <i>C. glutamicum</i>
Фенилаланин	<i>B. flavum</i> , <i>C. glutamicum</i>
Пролин	<i>B. flavum</i>
Серин	<i>C. glutamicum</i>
Треонин	<i>B. flavum</i> , <i>C. glutamicum</i> , <i>Arthrobacter parafinens</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. marcescens</i>
Триптофан	<i>Micrococcus</i> , <i>Candida utilis</i> , <i>B. subtilis</i>
Тирозин	<i>B. flavum</i> , <i>C. glutamicum</i>
Валин	<i>B. flavum</i> , <i>C. glutamicum</i>

терии и 10 % — микроскопические грибы. И лишь один из обследованных штаммов микроорганизмов — *Corynebacterium glutamicum* был способен к сверхсинтезу глутамата. Этот штамм использовали при организации первого в мире крупномасштабного производства глутаминовой кислоты микробиологическим методом в Токио (1956). В России изыскания в области промышленного синтеза аминокислот были начаты в 50-х годах XX в. по инициативе академика А. А. Александрова.

Перспективные штаммы продуцентов постоянно улучшают посредством селекции мутантов с измененной генетической программой и регуляторными свойствами. Распространенные объекты селекции продуцентов — микроорганизмы, относящиеся к родам *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter* (табл. 3.4).

Разработка технологической схемы получения отдельной аминокислоты полностью базируется на знании путей и механизмов регуляции биосинтеза конкретной аминокислоты. Необходимого дисбаланса метаболизма, обеспечивающего сверхсинтез целевого продукта, добиваются путем строго контролируемых изменений состава и условий среды.

### ***Микробиологические методы производства аминокислот***

**Производство лизина.** По содержанию лизина наименее сбалансированы белки злаковых культур, у которых его дефицит составляет от 20 до 50%. На территории России недостаток лизина в кормах не может быть восполнен за счет сои, поэтому в нашей стране производство этой аминокислоты было организовано первым. Для удовлетворения потребностей животноводства в лизине крупнотоннажное производство налажено в Японии, США, Германии, странах Южной Америки. Среди ведущих компаний на мировом рынке L-лизина бесспорное первенство принадлежит японской компании «Ajinomoto» и американской «Archer Daniels and Midlands», контролирующим по 40 % мирового производства лизина каждая. Особенностью этого рынка является постоянное превышение спроса над предложением. Российский рынок чистого лизина оценивается сегодня в 8 — 8,5 тыс. т. Более 95 % производимого в мире лизина используется в свиноводстве и птицеводстве для добавления к кормам.

В клетках микроорганизмов лизин синтезируется из аспарагиновой кислоты и служит конечным продуктом разветвленного метаболического пути биосинтеза, общего для трех аминокислот — лизина, метионина и треонина (рис. 3.3).

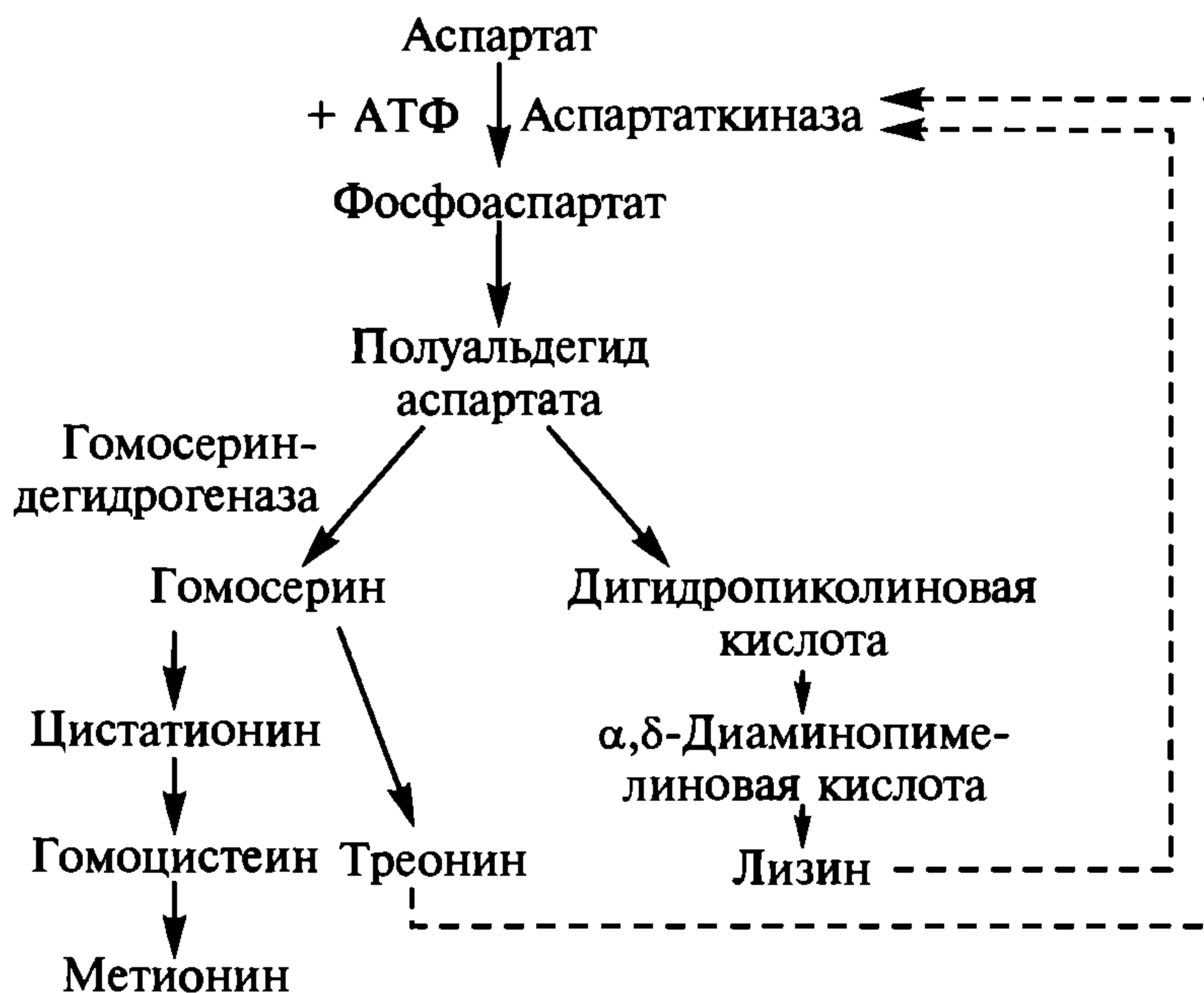


Рис. 3.3. Схема биосинтеза лизина, метионина и треонина в клетках *Corynebacterium glutamicum* и *Brevibacterium flavum*. Ингибирование по принципу обратной связи обозначено --->

Таким образом, в процессе новообразования аминокислот из общего предшественника одновременно с лизином возникают две другие аминокислоты — метионин и треонин. В этом случае эффекта накопления в среде всего одной целевой аминокислоты добиваются путем блокирования процессов, ведущих к синтезу побочных аминокислот, возникающих в связи с разветвлением метаболического пути.

Образование лизина в клетке бактерии находится под строгим метаболическим контролем. У типичных продуцентов L-лизина — *Brevibacterium flavum* и *Corynebacterium glutamicum* — фермент аспартаткиназа, открывающий метаболический путь, является аллостерическим белком, чувствительным к ингибированию по принципу обратной связи при совместном и согласованном действии побочных продуктов L-треонина и L-лизина. При накоплении треонина и лизина в избыточной концентрации ингибируется аспартаткиназа и их синтез останавливается, при пониженной концентрации любой из двух аминокислот процесс активизируется.

Чтобы добиться образования лизина в больших количествах, получают мутанты двух типов. У мутантов первого типа не синтезируется или не функционирует гомосериндегидрогеназа, в результате чего блокируется синтез метионина и треонина. Такие мутанты являются ауксотрофами по гомосерину или треонину (метионину); внутриклеточная концентрация треонина у них суще-

ственно снижена, что снимает блокаду с аспартаткиназы. Поэтому при выращивании мутантных штаммов в среде, где присутствуют лимитирующие концентрации метионина и треонина, они способны образовывать избыточные количества лизина. Мутанты второго типа дефектны по структурному гену, детерминирующему конформацию аспартаткиназы. В итоге фермент теряет чувствительность к высоким концентрациям аллостерического ингибитора — лизина.

Важный фактор, обеспечивающий в культуральной среде высокие концентрации аминокислоты, синтезированной внутри клетки, — проницаемость клеточных мембран. Проницаемость клеточной мембраны увеличивают либо с помощью мутаций, либо путем изменения состава питательной среды. В последнем случае в культуральной среде создают дефицит биотина (1 — 5 мкл/л), добавляют пенициллин (2 — 4 мкг/л), детергенты (твин-40 и твин-60) или производные высших жирных кислот (пальмитаты, стеараты). Биотин контролирует содержание в клеточной мембране фосфолипидов, а пенициллин нарушает биосинтез клеточных стенок бактерий, что повышает выделение аминокислот в среду.

Для культивирования штаммов микроорганизмов при производстве аминокислот как источники углерода наиболее доступны углеводы — глюкоза, сахароза и реже фруктоза и мальтоза. Для снижения стоимости питательной среды в качестве источников углерода используют вторичное сырье: свекловичную мелассу, молочную сыворотку, гидролизаты крахмала, сульфитные щелока. Технология этого процесса совершенствуется в направлении разработки дешевых синтетических питательных сред на основе уксусной кислоты (до 1,5 %), пропионовой кислоты, метанола, этанола (до 1 %) и *n*-парафинов. В качестве источников азота применяют мочевины и соли аммония (сульфаты и фосфаты). Для успешного развития микроорганизмы нуждаются в стимуляторах роста, в качестве которых выступают экстракты кукурузы, дрожжей и солодовых ростков, гидролизаты отрубей и дрожжей, витамины группы В. Кроме того, в питательную среду добавляют необходимые для жизнедеятельности макро- и микроэлементы (P, Ca, Mg, Mn, Fe и др.). На процесс биосинтеза аминокислот существенное влияние оказывает снабжение воздухом, при этом степень аэрации индивидуальна для производства каждой конкретной аминокислоты. Стерильный воздух подается специальными турбинными мешалками (рис. 3.4). Опыты показали, что лизин появляется в культуральной среде начиная с середины экспотенциальной фазы роста культуры клеток микроорганизма и достигает максимума к ее концу. Поэтому на первой стадии технологического процесса формируют биомассу продуцента, которую

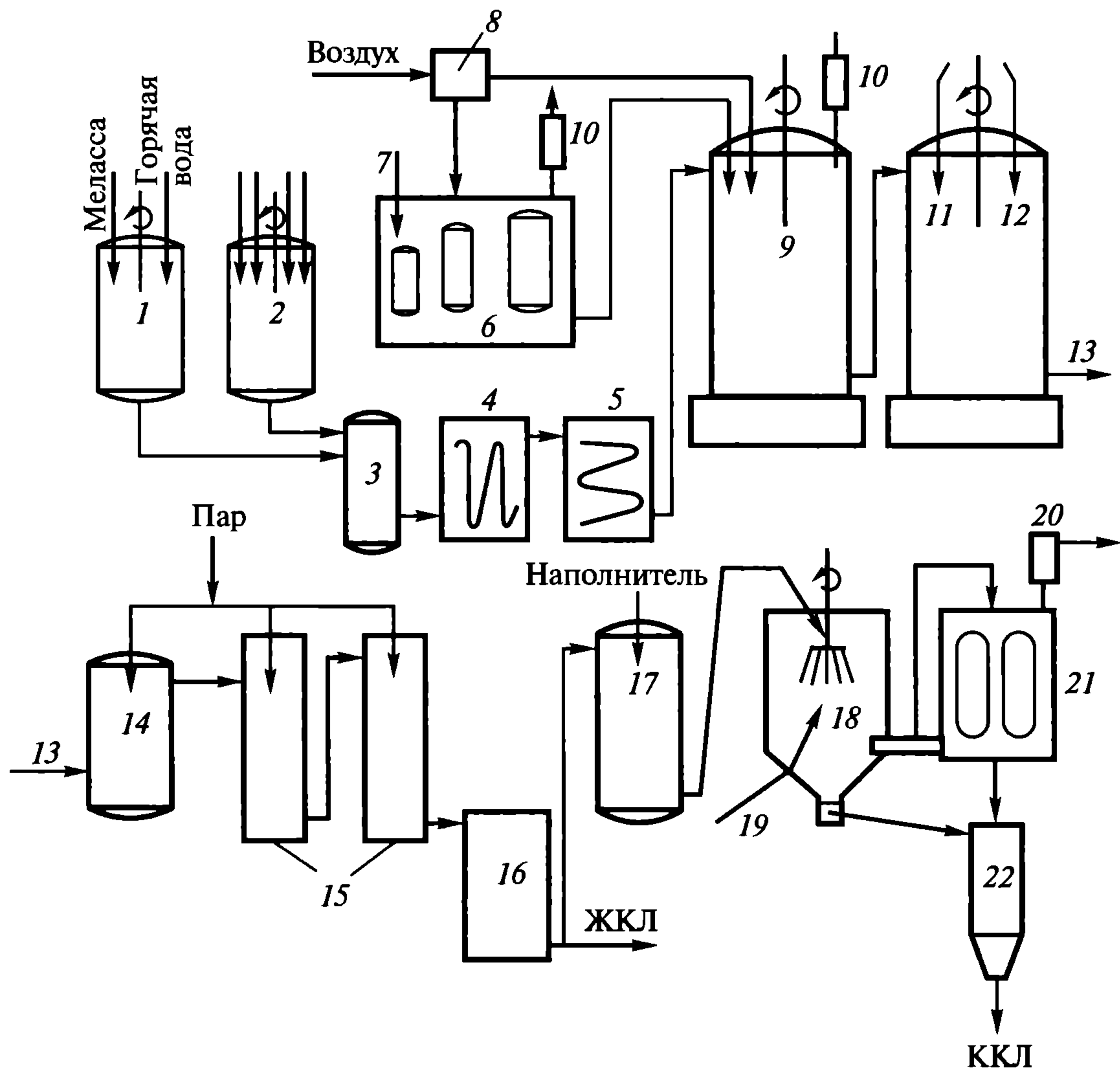


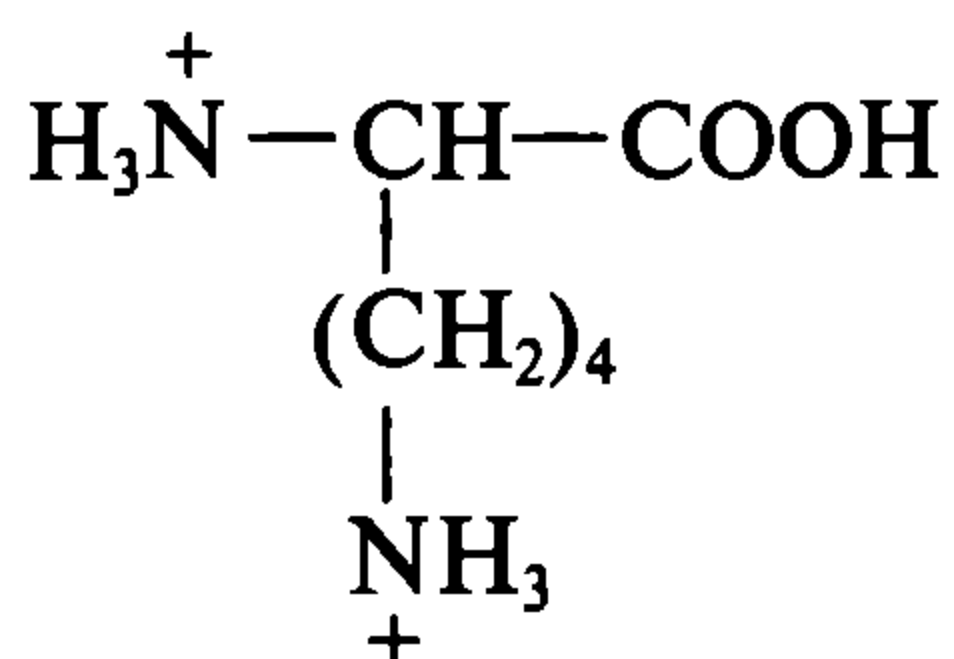
Рис. 3.4. Технологическая схема получения кормовых препаратов лизина (по В. С. Шевелухе и др., 1998):

1 — подача свекловичной мелассы; 2 — водная суспензия кукурузного экстракта и питательных солей; 3 — нагревательная колонка; 4, 5 — теплообменники; 6 — посевные аппараты; 7 — подача посевного материала; 8 — система фильтров для очистки и стерилизации воздуха; 9 — ферментер; 10 — фильтры для очистки отходящих газов; 11 — получение монохлоридгидрата лизина; 12 — подача соляной кислоты; 13, 14 — выход и подогрев монохлоридгидрата лизина; 15 — выпаривательная установка; 16 — сборник ЖКЛ; 17 — смешивание ЖКЛ с наполнителем; 18 — распылитель; 19 — подача горячего воздуха; 20 — очиститель воздуха; 21 — отделение сухого препарата лизина от воздуха; 22 — приемник ККЛ

выращивают в специальных посевных аппаратах в течение суток (рН 7,0—7,2; температура 28—30 °С), а затем подают в производственный ферментер, заполненный питательной средой. Лизин начинает поступать в культуральную жидкость через 25—30 ч после начала ферментации. По завершении процесса ферментации (через 55—72 ч) жидкую фазу отделяют от культуры клеток

микроорганизма фильтрованием и используют для выделения из нее лизина.

Высокоочищенные препараты лизина получают после фракционирования фильтрата культуральной жидкости методом ионообменной хроматографии на катионите. С этой целью лизин переводят в форму катиона:



Для данного процесса фильтрат обрабатывают соляной кислотой до рН 1,6 — 2,0 ( $\text{pH} < \text{pK}_1$ ). Обладая двумя положительно заряженными ионогенными группировками, лизин прочно сорбируется на смоле и элюируется с нее в виде индивидуального соединения 0,5 — 5 %-м раствором гидроксида аммония после выхода всех других катионов. Элюат концентрируют в вакууме при температуре 60 °С, переводят в форму монохлоргидрата, после чего высушивают и дополнительно чистят с помощью перекристаллизации. В результате получают препараты кристаллического лизина 98 — 99%-й чистоты, которые используют для повышения питательной ценности пищевых продуктов и в медицинской промышленности.

Кроме высокоочищенных препаратов лизина получают иные виды его товарной формы: жидкий концентрат лизина (ЖКЛ), сухой кормовой концентрат лизина (ККЛ) и высококонцентрированные кормовые препараты, характеризующиеся относительно меньшей степенью очистки в сравнении с первым препаратом.

Второй по значимости незаменимой аминокислотой для питания человека и животных является *метионин*, который получают преимущественно путем химического синтеза, что экономически более выгодно в сравнении с микробиологическим способом.

**Производство триптофана.** Триптофан достаточно часто является лимитирующим фактором питания, так как его содержание в традиционных продуктах (рыба, молоко, кормовые дрожжи) в три раза ниже, чем в стандартном белке.

Подобно лизину триптофан образуется в ходе разветвленного метаболического пути, поэтому для его производства используют ауксотрофных мутантов, у которых блокированы реакции, ведущие к синтезу фенилаланина и тирозина. Однако при выращивании мутантных штаммов в среде с минимальной концентрацией этих аминокислот, не вызывающей регуляторных эффектов, избыточное накопление триптофана в среде не наблюдается, что объясняется особенностью процессов регуляции биосинтеза триптофана у микроорганизмов.



Наряду с другими ароматическими аминокислотами у микроорганизмов (подобно большинству организмов) триптофан образуется из метаболитов углеводного обмена — эритрозо-4-фосфата и фосфоенолпирувата.

Процесс новообразования ароматических аминокислот идет через шикимовую и хоризмовую кислоты. Метаболическим предшественником триптофана служит антраниловая кислота, которая возникает из хоризмовой кислоты под действием антранилатсинтазы. Триптофан оказывает ингибирующее действие на антранилатсинтазу, поэтому для обхода метаболического контроля синтез фермента индуцируют ступенчатым введением предшественника — антраниловой кислоты (0,1 — 0,3 %):



В связи с этой особенностью промышленное производство триптофана организовано преимущественно по двухступенчатой схеме. На первом этапе химическим способом синтезируют антраниловую кислоту, которую с помощью энзиматической системы мутантных штаммов дрожжей *Candida utilis* переводят в триптофан.

Биомассу дрожжей выращивают при температуре 30 °С в среде, содержащей свекловичную мелассу, мочевины и минеральные компоненты. Через сутки в ферментер вводят 5%-й спиртовой раствор антраниловой кислоты и 50%-й раствор мочевины, а через 3 — 4 ч после введения предшественника дополнительно добавляют источник углерода (25%-й раствор мелассы). Антраниловую кислоту и мочевины подают через каждые 6 ч, а мелассу — через каждые 12 ч. Процесс двухступенчатой ферментации завершается через 144 ч и обеспечивает содержание триптофана в культуральной среде до 6 г/л.

Кроме триптофана микробиологическим способом с использованием предшественников получают гистидин, изолейцин, метионин, серин и треонин.

Менее распространены одноступенчатые технологии получения триптофана на основе ауксотрофных мутантов бактерии *Bacillus subtilis*, осуществляемые по схеме, близкой к способу получения лизина. Длительность одноступенчатого процесса 48 ч, а концентрация триптофана в культуральной среде составляет 10 г/л.

После сушки культуральной жидкости получают кормовой концентрат триптофана (ККТ), который включает белки, свободный триптофан, витамины В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub> и РР. Высокоочищенные кристаллические препараты триптофана образуются после дополнительной очистки культуральной жидкости методом ионообменной хроматографии на колонке, заполненной катионитом (сорбция при рН 1,0; элюция 5р%-м раствором гидроксида аммония в смеси с пропанолом-2). Элюаты кристаллизуют; кристаллы отмывают и высушивают. Кристаллический препарат содержит до 99 % триптофана.

Получены положительные результаты в увеличении выхода (до 13%) триптофана, синтезируемого *Corynebacterium glutamicum*. Для этого в клетки *C. glutamicum* дикого типа введена вторая копия гена, кодирующего анранилатсинтазу — фермента, лимитирующего синтез триптофана. Еще более высокий уровень синтеза триптофана достигается при введении в клетки бактерий модифицированных генов трех ключевых ферментов: 3-дезоксидарабиногептулозонат-7-фосфатсинтазы, анранилатсинтазы и анранилатфосфорибозилтрансферазы, в итоге энзимы теряют чувствительность к концентрации конечного продукта (ретроингибирование).

Характерная особенность процессов получения аминокислот микробиологическим способом, равно как и других биотехнологических производств, — полное использование побочных продуктов, что превращает большинство из них в безотходные и экологически чистые технологии. Например, осадок микроорганизмов-продуцентов и промывные воды, содержащие ценные ингредиенты, такие, как белки, остатки аминокислот, витаминов, минеральных солей и микроэлементов, высушивают и используют в качестве кормовых препаратов.

**Получение аргинина, глутаминовой кислоты, глутамина, треонина и пролина микробиологическим способом.** Для получения аминокислот — конечных продуктов неразветвленных метаболических путей, например *аргинина*, ауксотрофные мутанты не используют. В этом случае применяют мутанты с дефектами регуляции биосинтеза аминокислоты, т.е. регуляторные мутанты. Помимо аргинина регуляторные мутанты используют для получения серина и цитруллина:

[illegible]

Успешное производство с участием микроорганизмов таких аминокислот, как *глутаминовая кислота*, *глутамин* и *пролин*, обеспечивает стимуляция образования аминокислот в ответ на изменение условий внешней среды. Метаболическим предшественником при биосинтезе глутаминовой кислоты служит  $\alpha$ -кетоглутаровая кислота, возникающая в цикле Кребса из изолимонной кислоты под действием изоцитратдегидрогеназы. При выращивании бактерий родов *Corynebacterium* или *Brevibacterium* на углеводном сырье (гидролизат крахмала, тростниковая или свекловичная меласса), на этаноле или ацетате и при дефиците биотина в культуральной среде накапливается глутаминовая кислота с концентрацией 30 г/л. Важнейшее условие для образования этой аминокислоты — подавление активности глутаматдегидрогеназы. При высоком содержании в среде биотина и солей аммония обеспечиваются условия для образования пролина, а при значительных концентрациях ионов аммония и ионов цинка в слабокислой среде — для синтеза глутамина.

Генетическая инженерия — важнейший прогрессивный способ изменения генетической программы организма в целях создания высокопродуктивных штаммов промышленных микроорганизмов. Успехи современной генетической инженерии существенно влияют на промышленную биотехнологию. Яркий пример больших возможностей генетической инженерии — создание во ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов штамма *E. coli* для получения *треонина* (В. Г. Дебабов с сотр., 1980). В результате были изменены не только регуляторные свойства фермента аспартаткиназы, но и питательные потребности штамма. Введение в геном бактерии нового гена обеспечило бактерии возможность использования в качестве источника углерода сахарозу, основного дисахарида традиционного промышленного сырья — свекловичной мелассы. Перечисленные манипуляции наряду с амплификацией плазмид, содержащих часть оперона *треонина* (промотор, гены, кодирующие аспартаткиназу, гомосериндегидрогеназу и гомосеринкиназу), позволили значительно увеличить производительность штамма бактерии и получить за 40 ч ферментации 100 г L-треонина на 1 л культуральной жидкости. Учитывая исключительные способности штамма *E. coli* к сверхсинтезу L-треонина, японская фирма «Ajinomoto» приобрела в 1982 г. лицензию на использование российского штамма — производителя *треонина* — для организации собственного производства.

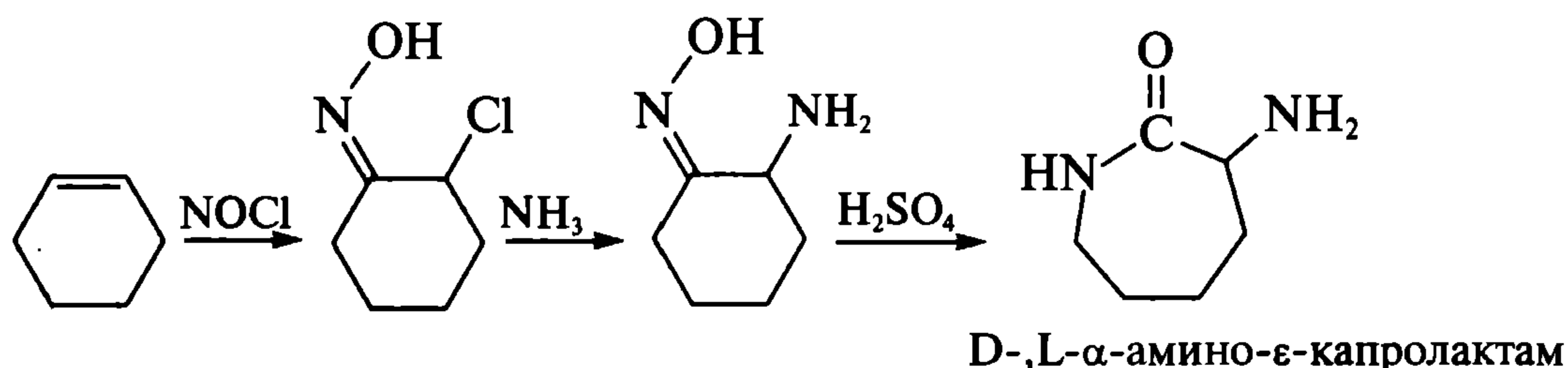
# Химико-ферментативные способы получения аминокислот

При получении ряда аминокислот химико-ферментативными способами используют энзимы, принадлежащие к разным классам. Эти процессы могут быть одностадийными (конверсии), и многостадийными. Источником ферментов для большинства процессов служат энзимы микроорганизмов — как индивидуальные, так и их природные смеси, содержащиеся в интактных (не растущих), высушенных и лизированных клетках, клеточных экстрактах и, наконец, в препаратах иммобилизованных клеток и ферментов.

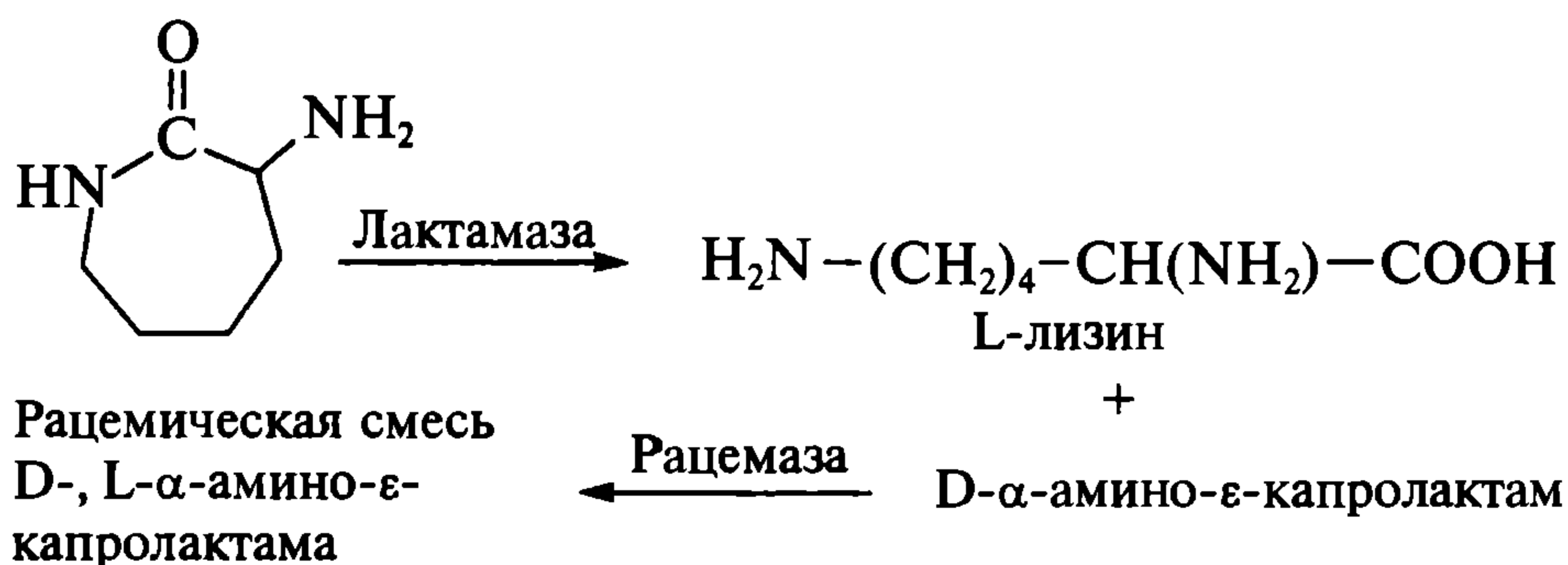
Использование иммобилизованных ферментов в биотехнологии рассмотрено в гл. 4.

Применение ферментов в производстве аминокислот обеспечивает стереоспецифичность процессов их синтеза, что выгодно отличает биотехнологические производства от химических. Рассмотрим примеры, иллюстрирующие эти положения.

**Получение L-лизина.** Процесс получения лизина основан на стереоспецифическом ферментативном гидролизе (конверсии) D-, L- $\alpha$ -амино- $\epsilon$ -капролактама, который сначала получают химическим путем из циклогексена:

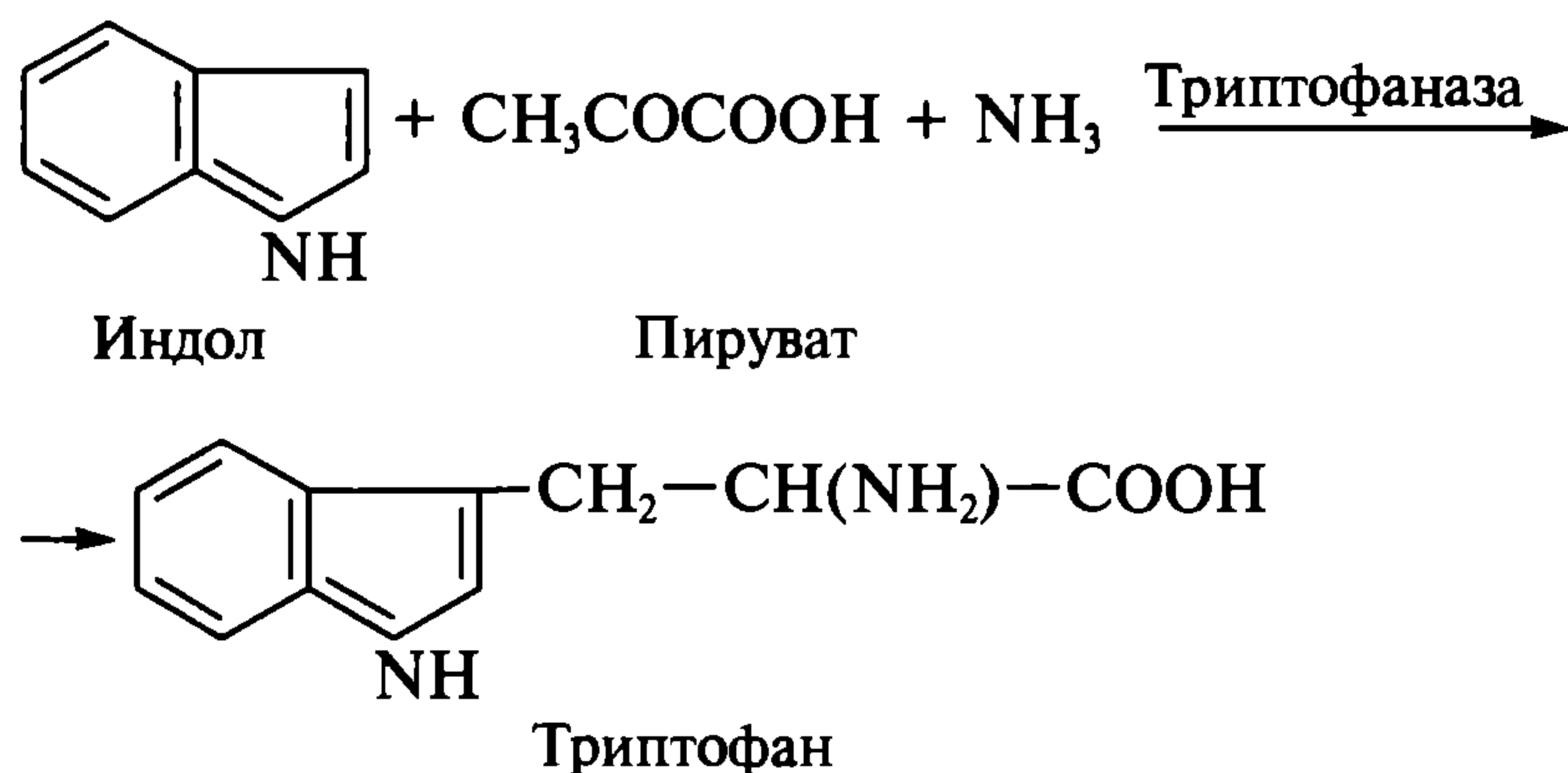


Рацемат используют в качестве субстрата, который под действием фермента L- $\alpha$ -амино- $\epsilon$ -капролактамагидролазы (лактамаза) превращается в L-лизин, а оставшаяся непрореагировавшая его часть (D-форма) переводится при воздействии рацемазы в смесь антиподов:



Лактамаза найдена у некоторых видов дрожжей, в частности у *Candida laurentii*; у них синтез фермента индуцируется добавлением субстрата (рацемической смеси), а активность энзима поддерживается при добавлении в среду ионов  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  и  $Zn^{2+}$ . Рацемаза обнаружена у ряда бактерий, например у *Alcaligenes obae*. Для получения неочищенных ферментов целые клетки микроорганизмов обрабатывают поверхностно-активными веществами, вызывающими изменение проницаемости стенки клеток микроорганизмов-продуцентов. Разработаны иммобилизованные формы обоих ферментов. При производстве лизина в водный раствор D-, L- $\alpha$ -амино- $\epsilon$ -капролактама одновременно вводят источники лактамазы и рацемазы, содержащиеся в дрожжевых и бактериальных клетках. Процесс осуществляется при температуре 30—50 °С, pH 8,0—8,5 и оптимальном режиме аэрации. На выходе из реактора образуется преимущественно один продукт — лизин, который выделяют из смеси, очищают и сушат. Описанная технология получения лизина, распространенная в США и Японии, по завершении процесса обеспечивает содержание аминокислоты в реакционной среде свыше 150 г/л. Кроме того, созданы мутанты, у которых целевой продукт — лизин далее не вовлекается в обмен веществ, что увеличивает выход искомого продукта.

**Получение триптофана.** Химико-ферментативный способ получения триптофана состоит в прямой конденсации индола, аммиака и пировиноградной кислоты:



Реакцию катализирует пиридоксальзависимая триптофан-индоллиаза (триптофаназа). Фермент широко распространен в природе. Он найден у бактерий *E. coli*, *Bacillus albei*, *Proteus rettgeri* и характеризуется широкой субстратной специфичностью. Кроме L-триптофана его субстратами служат L-цистеин, S-метил-цистеин,  $\beta$ -хлор-L-аланин, L-серин. Триптофаназа ускоряет реакции  $\alpha,\beta$ -элиминирования и  $\beta$ -замещения, но ее действие может быть обращено и в сторону реакции конденсации. Добавление триптофана индуцирует образование фермента, а добавление ин-

дола ингибирует его синтез у бактерий, поэтому процесс получения триптофана ведут при избытке аммиака и пирувата.

Выход аминокислоты при реализации химико-энзиматического способа получения триптофана составляет 63 г/л.

Набор энзимов, использующихся для получения аминокислот, достаточно разнообразен. К их числу относятся гидролазы, дегидрогеназы, лиазы, лигазы, изомеразы. Столь же разнообразен и перечень целевых аминокислот, производимых химико-ферментативным способом (L-аспарагиновая кислота, L-аланин, L-глютамин, L-лизин, L-тирозин, L-триптофан, L-цистеин, L-фенилаланин, L-метионин). Химико-энзиматический способ в сравнении с микробиологическим более специфичен, не требует процедуры очистки аминокислот от побочных продуктов и сточных потоков. Однако по стоимости сырья и ферментативных препаратов он еще уступает микробиологическому способу.

### 3.3.2. Производство витаминов

Витамины представляют собой группу незаменимых органических соединений различной химической природы, необходимых любому организму в ничтожных концентрациях и выполняющих в нем каталитические и регуляторные функции. Недостаток того или иного витамина нарушает обмен веществ и нормальные процессы жизнедеятельности организма, приводя к развитию патологических состояний. Витамины не образуются у гетеротрофов. Способностью к синтезу витаминов обладают лишь автотрофы, в частности растения. Многие микроорганизмы также образуют целый ряд витаминов, поэтому синтез витаминов с помощью микроорганизмов стал основой для разработки технологий промышленного производства этих биологически активных соединений.

Благодаря изучению физиологии и генетики микроорганизмов — продуцентов витаминов и выяснению путей биосинтеза каждого из них создана теоретическая основа для получения микробиологическим способом практически всех известных в настоящее время витаминов. Однако с помощью энзимов целесообразнее производить лишь особо сложные по строению витамины:  $B_2$ ,  $B_{12}$ ,  $\beta$ -каротин (провитамин А) и предшественники витамина D. Остальные витамины либо выделяют из природных источников, либо синтезируют химическим путем. Витамины используются в качестве лечебных препаратов, для создания сбалансированных пищевых и кормовых рационов и для интенсификации биотехнологических процессов.

**Получение витамина  $B_2$  (рибофлавин).** Вплоть до 30-х годов прошлого столетия рибофлавин выделяли из природного сырья.

В наибольшей концентрации он присутствует в моркови и печени трески. Из 1 т моркови можно изолировать лишь 1 г рибофлавина, а из 1 т печени — 6 г. В 1935 г. обнаружен активный продуцент рибофлавина — гриб *Eremothecium ashbyii*, способный при выращивании на 1 т питательной смеси синтезировать 25 кг витамина В<sub>2</sub>. Сверхсинтеза рибофлавина добиваются действием на дикие штаммы мутагенов, нарушающих механизм ретроингибирования синтеза витамина В<sub>2</sub>, флавиновыми нуклеотидами, а также изменением состава культуральной среды. Отбор мутантов ведут по устойчивости к аналогу витамина В<sub>2</sub> — розеофлавинолу. Вопросы биосинтеза рибофлавина и его регуляции детально изучены в работах Г. М. Шавловского.

В состав среды для роста продуцентов витамина В<sub>2</sub> входят достаточно сложные органические вещества — соевая мука, кукурузный экстракт, сахароза, карбонат кальция, хлорид натрия, гидрофосфат калия, витамины, технический жир. Грибы весьма чувствительны к изменению состава среды и подвержены инфицированию. Перед подачей в ферментер среду подвергают стерилизации, добавляя к ней антибиотики и антисептики. Подготавливают жидкую питательную среду и посевной материал культуры дрожжей в разных емкостях — ферментере и посевном аппарате.

В качестве посевного материала используют споры *E. ashbyii*, выращенные на пшене (7—8 дней при 29—30 °С). После стерилизации жидкий посевной материал подается в ферментер. Процесс ферментации грибов для получения кормового рибофлавина длится 3 суток при температуре 28—30 °С. Концентрация рибофлавина в культуральной жидкости может достигать 1,4 мг/мл. По завершении процесса ферментации культуральную жидкость концентрируют в вакууме, высушивают на распылительной сушилке (влажность 5—10 %) и смешивают с наполнителями.

В 1983 г. во ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов сконструирован рекомбинантный штамм продуцента *Bacillus subtilis*, характеризующийся увеличенной дозой оперонов, которые контролируют синтез рибофлавина. Клонированием генов рибофлавинового оперона в одной из созданных плазмид был получен производственный штамм-продуцент витамина В<sub>2</sub>, способный синтезировать втрое больше по сравнению с *E. ashbyii* количество рибофлавина всего за 40 ч ферментации.

**Получение витамина В<sub>12</sub> (Со $\alpha$ [ $\alpha$ -(5,6-диметилбензимидазолил)]-Со $\beta$  — цианокобамид).** Витамин В<sub>12</sub> открыт в 1948 г. одновременно в США и Англии. В 1972 г. в Гарвардском университете был осуществлен химический синтез корриноидного предшественника витамина В<sub>12</sub>. Химический синтез корнестерона — структурного элемента корринового кольца витамина, включаю-



щий 37 стадий, в крупных масштабах не воспроизведен из-за сложности процесса.

Витамин  $B_{12}$  регулирует углеводный и липидный обмен, участвует в метаболизме незаменимых аминокислот, пуриновых и пиримидиновых оснований, стимулирует образование предшественников гемоглобина в костном мозге; применяется в медицине для лечения злокачественной анемии, лучевой болезни, заболеваний печени, полиневрита и т. п. Добавление витамина к кормам способствует более полноценному усвоению растительных белков и повышает продуктивность сельскохозяйственных животных на 10—15 %.

Первоначально витамин  $B_{12}$  получали исключительно из природного сырья, но из 1 т печени можно было выделить всего лишь 15 мг витамина. Единственный способ его получения в настоящее время — микробиологический синтез. Обнаружение витамина в качестве побочного продукта при производстве антибиотиков в значительной степени стимулировало поиск организмов-продуцентов витамина и изучение путей его образования. Однако механизмы регуляции биосинтеза витамина  $B_{12}$  до сих пор полностью не расшифрованы. Известно, что при высоких концентрациях витамин полностью репрессирует синтез ключевых ферментов своего новообразования.

Продуцентами витамина  $B_{12}$  при его промышленном получении служат актиномицеты, метанообразующие и фотосинтезирующие бактерии, одноклеточные водоросли. В 70-х годах XX в. интерес ученых привлекли пропионовокислые бактерии, известные еще с 1906 г. и широко используемые для приготовления препаратов животноводства. Выделено 14 видов пропионовокислых бактерий, продуцирующих витамин  $B_{12}$ ; их физиолого-биохимическая характеристика дана Л. И. Воробьевой. Для получения высокоочищенных препаратов витамина  $B_{12}$  пропионовокислые бактерии культивируют периодическим способом на средах, содержащих глюкозу, казеиновый гидролизат, витамины, неорганические соли, хлорид кобальта. Добавление в среду предшественника 5,6-диметилбензимидазола (способствует переводу неактивных форм в природный продукт) по окончании первой ростовой фазы (5—6 суток) стимулирует быстрый (18—24 ч) синтез витамина с выходом последнего 5,6—8,7 мг/л. Путем селекции, оптимизации состава среды и условий культивирования выход витамина  $B_{12}$  в промышленных условиях был значительно повышен. Так, выход витамина на среде с кукурузным экстрактом и глюкозой при поддержании стабильного значения рН близ нейтральных зон достигает 21—23 мг/л. Мутант пропионовокислых бактерий продуцирует до 30 мг/л витамина. Бактерии плохо переносят перемешивание. Применение уплотняющих агентов (агар, крахмал), предот-

вращающих оседание бактерий, а также использование высоко-анаэробных условий и автоматического поддержания рН позволяет получить наиболее высокий выход витамина — 58 мг/л.

Из культуральной жидкости витамин  $B_{12}$  выделяют экстракцией органическими растворителями, ионообменной хроматографией с последующим осаждением из фракций в виде труднорастворимых соединений. В процессе получения витамина  $B_{12}$  с помощью пропионовокислых бактерий применяют дорогостоящую антикоррозийную аппаратуру, сложные и дорогие питательные среды. Усовершенствование технологического процесса идет в направлении удешевления компонентов питательных сред (замена глюкозы сульфитными щелоками) и перехода с периодического культивирования на непрерывный процесс. В последние годы исследуется возможность получения витамина с использованием иммобилизованных клеток пропионовокислых бактерий.

Для нужд животноводства сотрудниками Института биохимии им. А. Н. Баха РАН была разработана более простая и дешевая технология получения витамина  $B_{12}$ , в создание которой большой вклад внесли работы В. Н. Букина, В. Я. Быховского, И. С. Логоткина, Е. С. Панцхавы и др.

По указанной технологии ферментацию осуществляет сложный биоценоз термофильных микроорганизмов, производящих метановое брожение. Комплекс микроорганизмов включает целлюлозоразлагающие, углеводсбраживающие, аммонифицирующие, сульфитвосстанавливающие и метанообразующие бактерии. На первой фазе процесса (10 — 12 дней) развиваются термофильные углеводсбраживающие и аммонифицирующие бактерии. При этом в слабокислой среде (рН 5,0 — 7,0) органические соединения превращаются в жирные кислоты и аммиак. На второй фазе, когда среду подщелачивают до рН 8,5, в биоценозе преобладают метанообразующие бактерии, которые сбраживают возникающие на первой фазе продукты до метана и диоксида углерода. Именно метанообразующие бактерии — главные продуценты витамина. Обогащение сред очищенными культурами метанообразующих бактерий увеличивает выход активных форм витамина  $B_{12}$ .

Источником углерода в питательной среде служит ацетонобутиловая и спиртовая барда, которую представляют заводы, перерабатывающие зерно и мелассу. Для оптимизации питательной среды в нее добавляют соединения кобальта (хлорид кобальта — 4 г/м<sup>3</sup>), который входит в состав молекулы витамина  $B_{12}$ , и субстраты для роста метанообразующих бактерий — низшие жирные кислоты и низшие спирты, что позволяет значительно повысить выход витамина.

Подготовленное сырье освобождают в декантаторе от взвешенных частиц и непрерывно подают в нижнюю часть ферментера (метантенка) вместимостью 4200 м<sup>3</sup>. Одновременно в ферментер

поступает посевной материал культуры микроорганизмов, предварительно выращенный в специальных аппаратах. Для выращивания продуцента требуются облигатно анаэробные условия, ибо даже следы кислорода подавляют рост бактерий. При создании анаэробных условий в среду подают диоксид углерода или газы, выделяющиеся в процессе ферментации. Ежедневно из метантенка отбирают 25 — 30 % объема среды. Продукт ферментации стабилизируют, подкисляя соляной или фосфорной кислотой до pH 6,3 — 6,5 и добавляя 0,2 — 0,25 % сульфита натрия, что предотвращает разрушение витамина при тепловой обработке, особенно существенное в щелочной среде. В дальнейшем отобранная часть культуральной жидкости дегазируется, упаривается в вакууме; концентрат высушивается в распылительной сушилке до влажности 10—15 % и смешивается с наполнителями. Готовый кормовой препарат, имеющий коммерческое название КМВ-12 (концентратмикробный витамин), содержит, кроме витамина B<sub>12</sub> (2,5 %) витамины B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, пантотеновую кислоту, фолиевую кислоту, биотин, незаменимые аминокислоты.

Процесс промышленного получения витамина B<sub>12</sub> — пример безотходной и экологически чистой технологии. Сырьем для ее реализации служат массовые отходы, а конечными продуктами — биогаз (65 % метана, 30 % диоксида углерода), использующийся как топливо, и биомасса метановых бактерий — источник биологически активных соединений, активирующих, например, рост молочнокислых бактерий.

Витамины — объекты международной торговли. Так, витамин B<sub>12</sub> российского производства экспортируется в Польшу, Германию, Чехию, Словакию и другие страны.

**Получение β-каротина и витамина D<sub>2</sub>.** Важное место в обмене веществ у животных занимает β-каротин, который в печени превращается в витамин А (ретинол). В организме человека и животных каротины не образуются. Основные источники β-каротина для животных — растительные корма; человек получает β-каротин также из продуктов животного происхождения. β-Каротин можно выделить из ряда растительных объектов — моркови, тыквы, облепихи, люцерны. В начале 60-х годов XX в. разработана схема микробиологического синтеза β-каротина, которая стала основой промышленного способа его получения. Установлено, что многие микроорганизмы — фототрофные бактерии, актиномицеты, плесневые грибы, дрожжи — синтезируют каротин. Характерно, что содержание β-каротина у микроорганизмов во много раз превышает содержание этого провитамина у растений. Так, в 1 г моркови присутствует всего 60 мкг β-каротина, в то время как в 1 г биомассы гриба *Blaneslea trispora* — 3 — 8 тыс. мкг. Разработаны опытные установки как периодического, так и непрерывного действия для син-

теза β-каротина, основной недостаток которых — высокая стоимость сырья и большая длительность процесса.

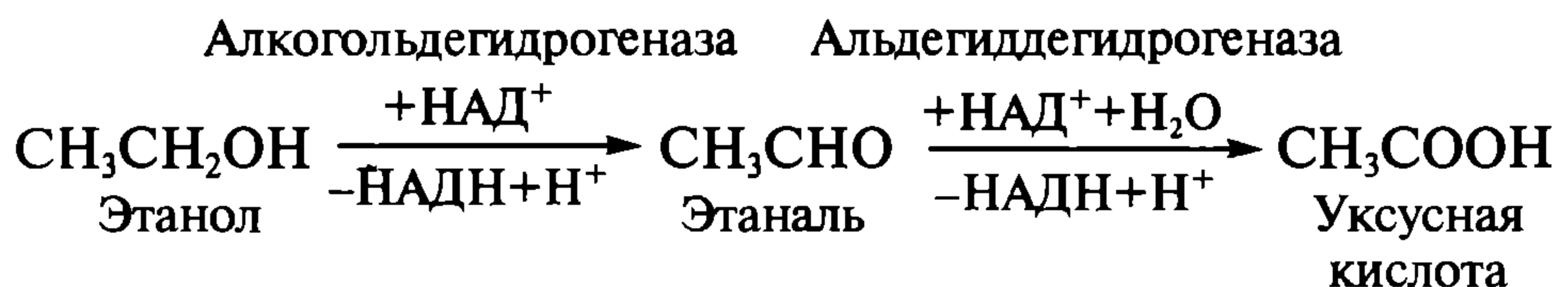
Микробиологическим способом получают и витамин D<sub>2</sub> (эргокальциферол), при производстве которого освоено дешевое сырье (углеводороды) и установлен стимулирующий эффект ультрафиолетовых лучей на синтез эргостерина культурой дрожжей.

В ближайшие годы ожидается расширение набора витаминов, получаемых методами биотехнологии. Для решения проблемы промышленного получения витаминов требуется внедрение непищевого малодефицитного сырья, разработка специальных режимов культивирования сверхпродуцентов, перевод процессов на непрерывные технологии, использование перспективных химико-ферментативных способов синтеза витаминов.

### 3.3.3. Производство органических кислот

В настоящее время биотехнологическими способами в промышленных масштабах синтезируют ряд органических кислот. Из них лимонную, глюконовую, кетоглюконовую и итаконовую кислоты получают лишь микробиологическим способом, молочную, салициловую и уксусную — как химическим, так и микробиологическим способами, а яблочную — химическим и энзиматическим путем.

**Получение уксусной кислоты.** Уксусная кислота имеет наиболее важное значение среди всех органических кислот. Ее используют при выработке многих химических веществ, включая каучук, пластмассы, волокна, инсектициды. Микробиологический способ получения уксусной кислоты состоит в конверсии этанола в уксусную кислоту при участии бактерий штаммов *Acetobacter* и *Gluconobacter*:

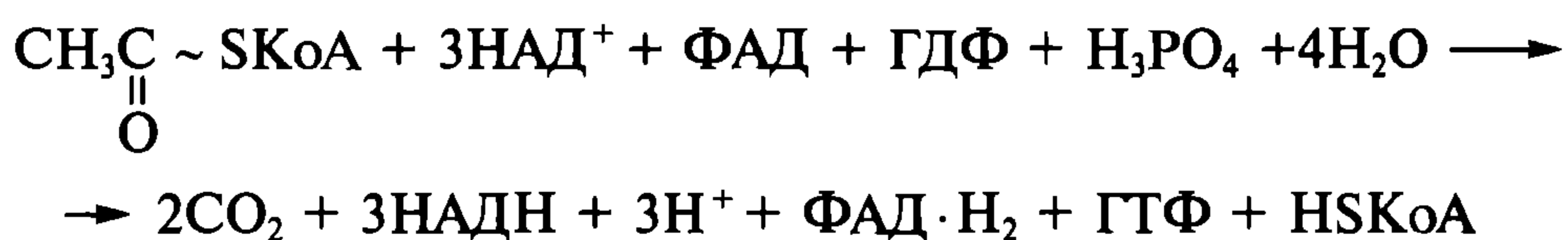


Процесс идет в анаэробных условиях в режиме непрерывного культивирования продуцента. Для роста бактерии *Acetobacter aceti* используют питательные среды, содержащие 6—12 % этилового спирта, 1 % бактериального гидролизата, 0,05 % дигидрофосфата калия, 0,1 % гидрофосфата аммония и 0,05 % сульфата магния. Максимальная удельная активность непрерывной культуры *A. aceti* (количество микрограммов субстрата, подвергшегося окислению 1 мкг биомассы за 1 мин) достигается к 20-м суткам культивирования при концентрации спирта 7 % и составляет 3,0 ед./мг.

**Получение лимонной кислоты.** Лимонную кислоту широко используют в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности. Ею заменяют фосфаты в составе детергентов, так как она полностью метаболизируется живыми организмами. Лимонная кислота образует хелаты с металлами, поэтому ее применяют для их очистки. Объем мирового производства цитрата составляет 400 тыс. т/год. Самый крупный производитель лимонной кислоты — США. Производство лимонной кислоты принадлежит к числу старейших промышленных микробиологических процессов: оно было организовано в 1893 г. С этого момента параллельно развитию фундаментальной микробиологии велись изыскания оптимальных продуцентов и технологических вариантов процесса ферментации.

Для промышленного производства лимонной кислоты используют главным образом культуру гриба *Aspergillus niger*, а также *A. wentii*.

Метаболическим источником лимонной кислоты в организме служит цикл трикарбоновых кислот — составная часть цикла Кребса. Суммарное уравнение химических процессов этого цикла следующее:



Реакция образования лимонной кислоты, катализируемая цитратсинтазой, открывает цикл Кребса, в котором цитрат постепенно окисляется до щавелево-уксусной кислоты (ЩУК). ЩУК снова конденсируется с ацетил-КоА, так что вновь образуется лимонная кислота (рис. 3.5). Цитратсинтаза определяет скорость реакций, составляющих цикл Кребса. Активность фермента зависит от концентрации ЩУК, содержание которой может поддерживаться за счет функционирования конститутивной пируваткарбоксилазы, обеспечивающей переключение в аэробных условиях процессов гликолиза и глиоксильного цикла. Активность цитратсинтазы тормозится НАДН и сукцинил-КоА. Скорость оборота цикла Кребса определяется поддержанием необходимого уровня окисленных форм коферментов дегидрогеназ (НАД<sup>+</sup> и ФАД; см. уравнение реакции), поэтому высокий выход цитрата получается лишь при условии хорошей аэрации. Накопление в культуральной среде существенных количеств цитрата — промежуточного соединения цикла Кребса — невыгодно для организма и является следствием дисбаланса метаболизма или нарушения его генетической природы. Рост культуры грибов обычно регулируют путем изменения содержания фосфата, ионов марганца, железа и цинка в среде. Дефицит

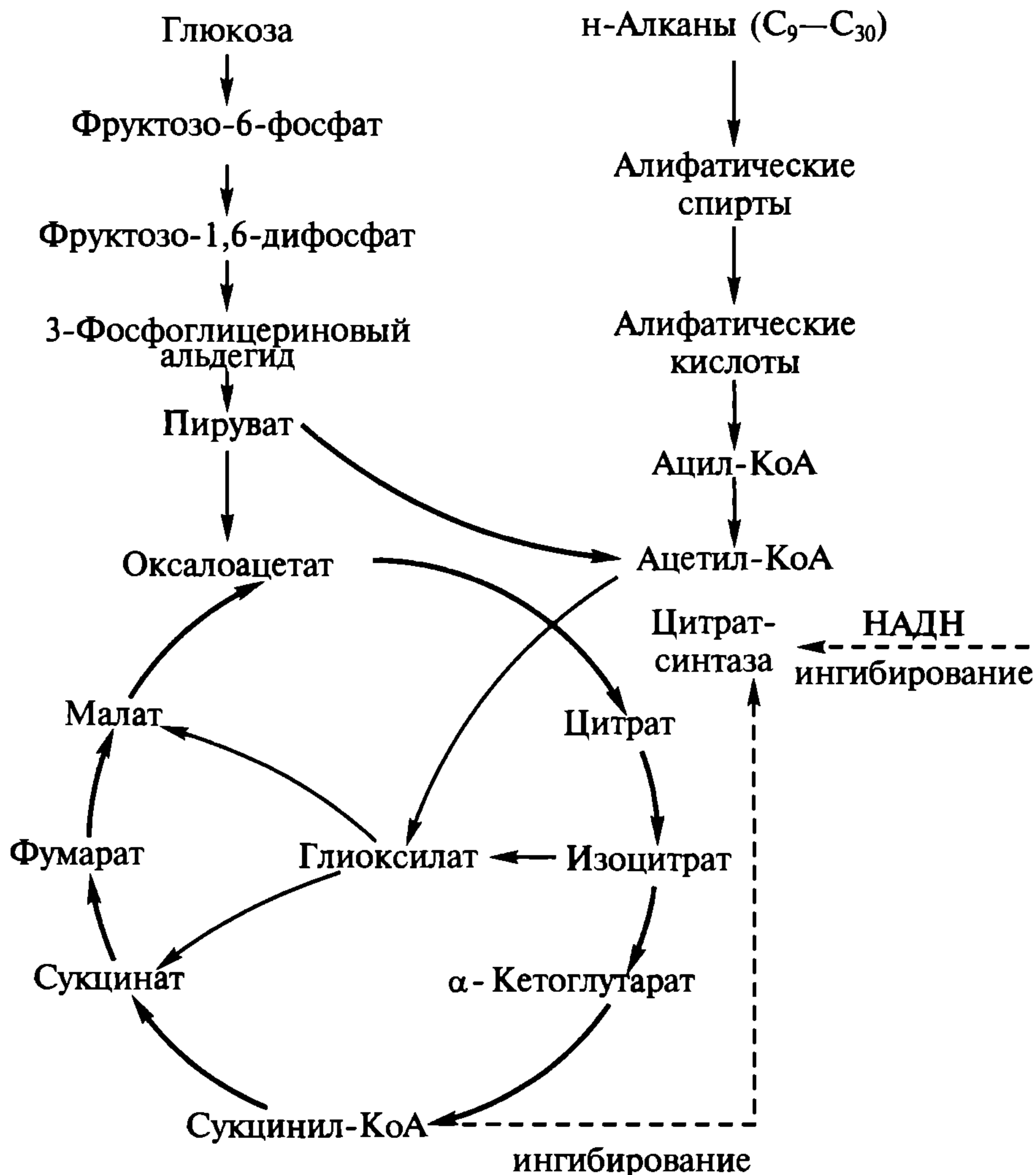


Рис. 3.5. Схема биосинтеза лимонной кислоты

фосфата ведет к сверхпродукции цитрата. Роль ионов металлов не до конца установлена. Считают, что дефицит ионов металлов влияет на свойства клеточных мембран и морфологию гиф.

Процесс ферментации, ведущий к образованию лимонной кислоты, проводят при низких значениях pH (3—4), что облегчает поддержание стерильных условий ферментации и уменьшает возможность образования побочных продуктов. В более щелочной среде происходит накопление щавелевой и глюконовой кислот. Предполагают, что в кислой среде стимулируется гликолиз, что обеспечивает направление потока углерода в цикл Кребса.

Питательные среды для культивирования продуцентов лимонной кислоты в качестве источника углерода содержат дешевое углеводное сырье: мелассу, крахмал и глюкозный сироп. Гриб *A. niger* чаще всего выращивают на мелассе. Гриб *Trichoderma viride* синтезирует значительные количества цитрата из глюкозы, что позволяет использовать для этого процесса целлюлозу. Предложены штаммы бактерий (*Corynebacterium*, *Arthrobacterium* и *Brevibacterium*) и дрожжей

рода *Candida*, осуществляющие процесс на основе *n*-парафинов ( $C_9—C_{30}$ ), которые пока широко не внедрены в промышленность.

Существует несколько технологических вариантов промышленного производства лимонной кислоты. Первоначально был разработан вариант процесса, основывающийся на поверхностной ферментации, позднее — на глубинном культивировании. Последнее ведется в две стадии: на первой стадии идет рост мицелия, а на второй, после выхода культуры в стационарную фазу — интенсивный синтез лимонной кислоты. В конце ферментации массу мицелия отделяют путем фильтрования и промывают. Затем при  $pH < 3,0$  в виде кальциевой соли осаждают щавелевую кислоту, а из маточного раствора выделяют лимонную кислоту в форме средней соли, кристаллизующейся в комплексе с четырьмя молекулами воды. Свободную кислоту выделяют из промытых кристаллов соли после их обработки сульфатом кальция. Высокоочищенные препараты лимонной кислоты получают после дополнительной процедуры очистки методом ионообменной хроматографии. Выход продукта составляет 85 %.

С 20-х годов XX в. налажено промышленное производство D-глюконовой кислоты из глюкозы при участии *A. niger*. При этом за 48 ч ферментации культуры гриба степень превращения субстрата составляет 90 %. Глюконат натрия, в виде которого обычно выделяют глюконовую кислоту, используют для извлечения металлов, борьбы со ржавчиной, как моющее средство и в качестве медицинского препарата. С участием культуры грибов из рода *Aspergillus* путем ферментации глюкозы получают с высоким выходом итаконовую кислоту, используемую для производства пластмасс и красителей.

Новые возможности для интенсификации производственных процессов получения органических кислот открывает применение иммобилизованных ферментов и клеток микроорганизмов.

## 3.4. БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

### 3.4.1. Получение антибиотиков

Принципы получения вторичных метаболитов основаны на особенностях их образования клетками микроорганизмов. Биосинтез вторичных метаболитов фазоспецифичен и происходит по завершении стадии роста, в идиофазе, благодаря чему их еще называют идиолитами (см. с. 32). Среди вторичных метаболитов ведущее место по объему производства занимают антибиотики.



В мире ежегодно производится 100 000 т антибиотиков на сумму примерно 20 млрд долларов. К числу антибиотиков относятся важнейшие противомикробные и противоопухолевые препараты. Открытие антибиотиков произвело переворот в лечении инфекционных заболеваний. Ушли в прошлое представления о неизлечимости многих бактериальных инфекций (туберкулез, сепсис, сифилис и др.). Антибиотики применяют в ряде отраслей народного хозяйства (растениеводство, животноводство, ветеринария, пищевая промышленность и др.), где они используются более широко, чем в медицине. Организация крупномасштабного производства антибиотиков сыграла решающую роль в становлении промышленной биотехнологии.

К антибиотикам относятся низкомолекулярные эффекторы изначально природного происхождения, способные подавлять рост живых клеток. Антибиотики, продуцируемые растительными объектами, называют фитонцидами. Вопрос о физиологических функциях антибиотиков, их месте в метаболизме и процессах эволюции окончательно не решен. Ряд исследователей полагают, что с помощью антибиотиков продуценты преодолевают «стрессовые» ситуации. Некоторые авторы связывают способность организмов к образованию антибиотиков с активацией ранее «молчащих» генов в новых условиях обитания микроорганизмов. Антибиотики возникли в борьбе за существование почвенных биоценозов, поэтому многие из них служат средствами нападения и защиты, т.е. представляют собой своеобразное химическое «оружие» клетки. Однако эти функции у антибиотиков не единственны. Известно, что они могут участвовать в процессах детоксикации вредных метаболитов, контролировать некоторые стороны обмена веществ и целые процессы развития, например дифференцировку клеток, служить запасными питательными веществами. Некоторые исследователи рассматривают антибиотики как случайные вещества, обладающие полезными свойствами, другие считают их реликтовыми молекулами, вытесненными в ходе эволюции продуктами рибосомального синтеза, но и до сих пор сохранившими способность вмешиваться в биохимические процессы.

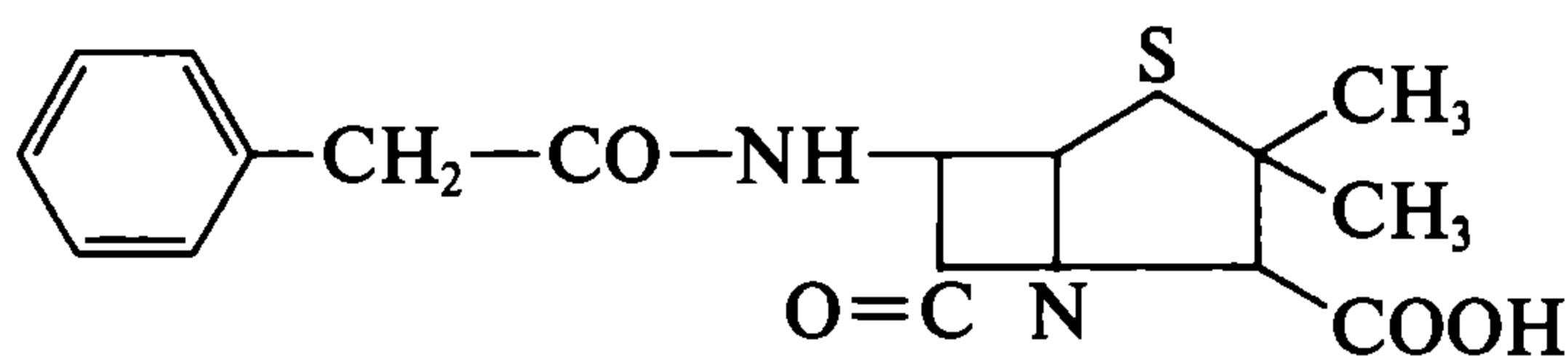
Способность нитчатого гриба зеленой плесени *Penicillium notatum* вызывать гибель микроорганизмов впервые была установлена в 1928 г. английским микробиологом А. Флеммингом. Однако лечебные свойства этой плесени были описаны еще в 1871 г. русским дерматологом А. Г. Полотебновым. Количество открываемых антибиотиков постоянно растет. В 1940 г. было известно всего 6 антибиотиков, а в настоящее время описано более 14 000 аналогичных соединений, из которых в клинике применяют около 200 препаратов. 98 % известных антибиотиков токсичны, поэтому в практике не используются. В химическом отношении они представ-

ляют сборную группу органических веществ. В зависимости от химической природы и ряда других свойств известные антибиотики делят на ряд классов:

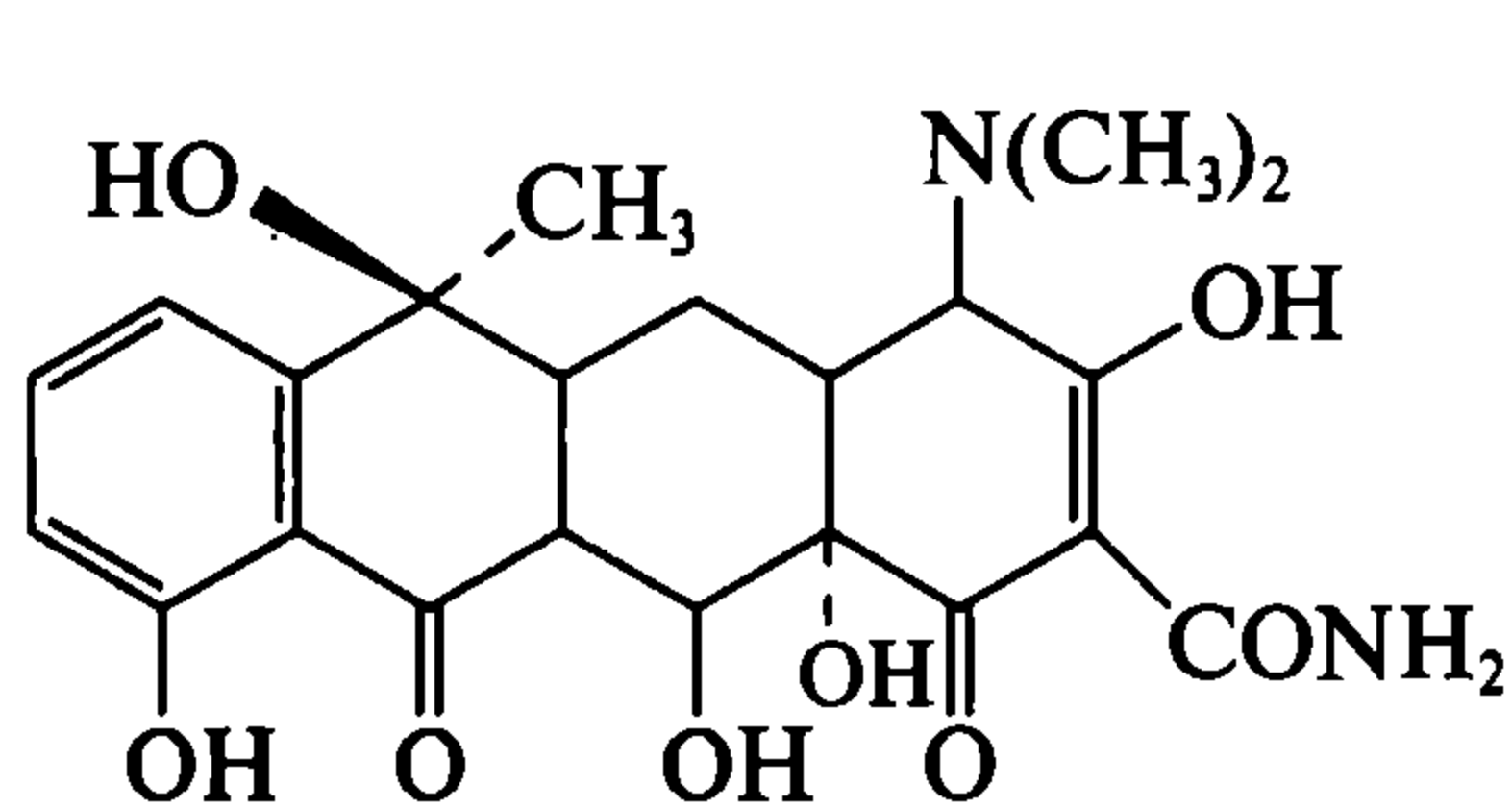
1.  $\beta$ -Лактамные (пенициллины, цефалоспорины; составляют более 50 % рынка антибиотиков).
2. Тетрациклины (тетрациклин, морфоциклин, метациклин).
3. Макролиды (эритромицин, олеандомицин).
4. Аминогликозиды (гентамицин, амикацин).
5. Гликопептиды (ванкомицин, ристомицин).
6. Амфениколы (левомицетин).
7. Линкосамиды (линкомицин).
8. Полиеновые [противогрибковые (нистатин, леворин)].
9. Противоопухолевые (блеомицин) и др.

Большой вклад в установление структуры ряда антибиотиков внесли М. М. Шемякин, Ю. А. Овчинников, В. Т. Иванов, А. С. Хохлов, Г. Б. Локшин, М. Н. Колосов, Ю. А. Берлин, Е. С. Есипов, А. Д. Кузовнов.

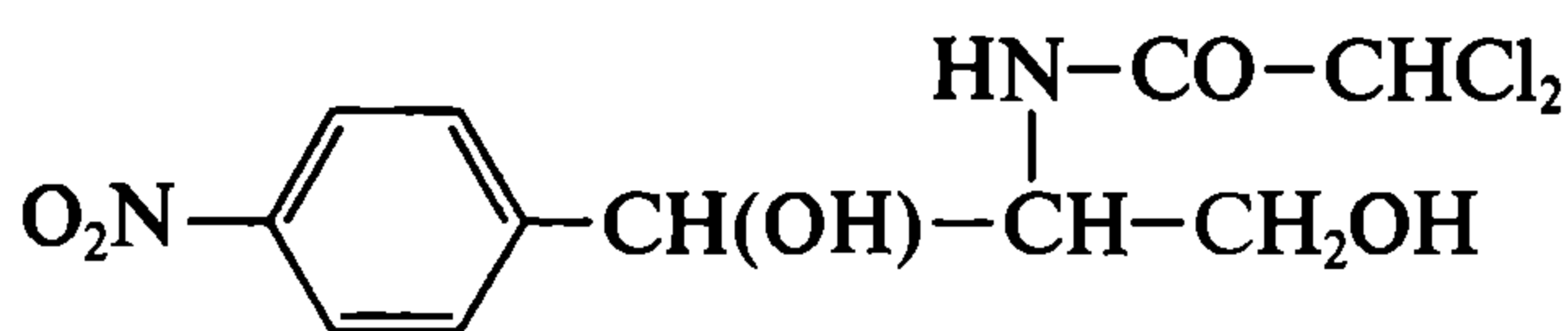
Химические формулы наиболее распространенных антибиотиков следующие:



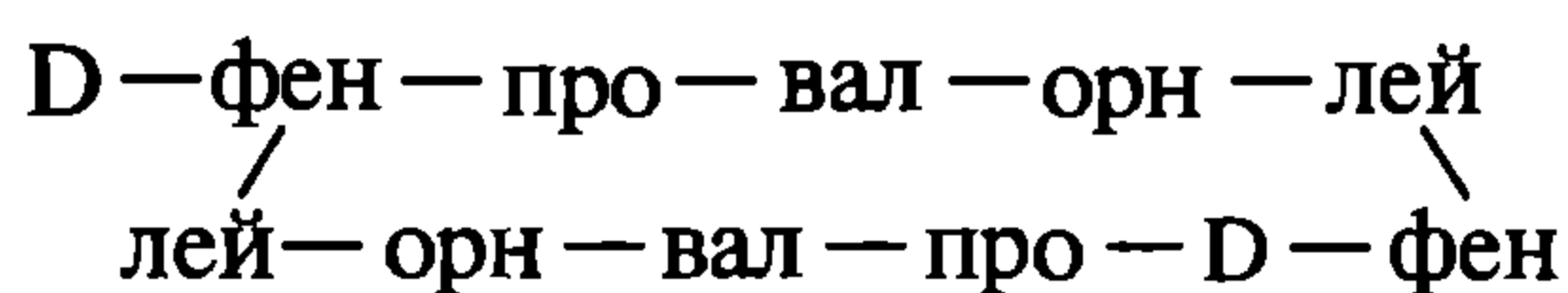
Бензилпенициллин



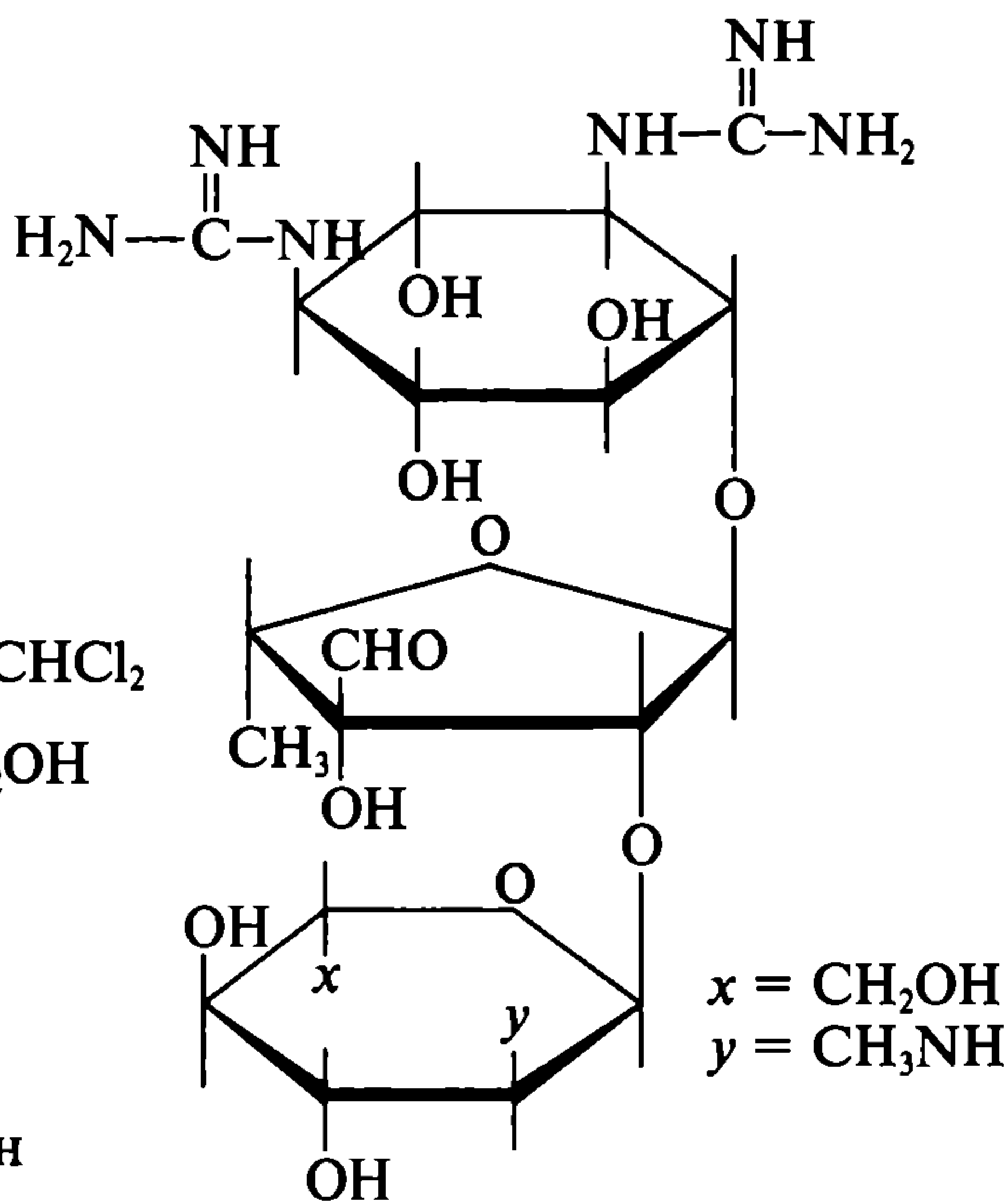
Тетрациклин



Левомецетин



Грамицидин



Стрептомицин

По типу действия антибиотики делят на бактерицидные (лактамы, аминогликозиды), вызывающие гибель микроорганизмов, и бактериостатические (макролиды, тетрациклины, левомицетин), нарушающие способность микроорганизмов делиться. По спектру действия различают антибиотики узкого и широкого действия. К последним относят тетрациклины, макролиды, аминогликозиды, которые особенно полезны в случае неидентифицированных возбудителей болезни, однако при длительном применении они вызывают у пациентов дисбактериоз.

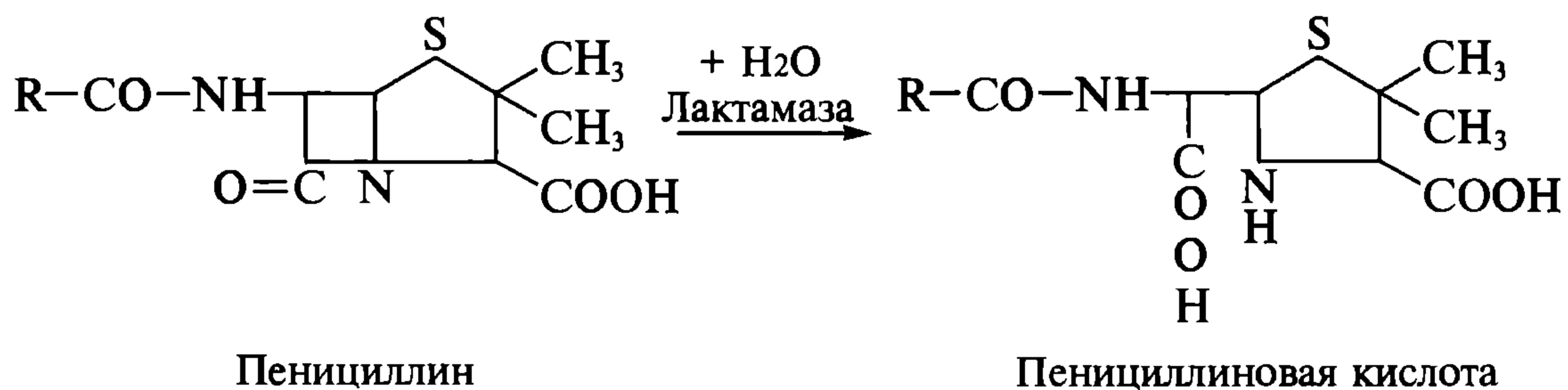
В последние годы достигнуты большие успехи в расшифровке молекулярного механизма действия антибиотиков. Наиболее яркая особенность антибиотиков — исключительная специфичность их действия. По выражению П. Эрлиха, антибиотики — это магические пули. Специфика действия их состоит в избирательном подавлении этими эффекторами одного или нескольких процессов лишь у некоторых микроорганизмов. Таким образом, антибиотики блокируют метаболические мишени в клетках-мишенях. В зависимости от специфики действия антибиотиков на молекулярном уровне различают следующие группы соединений, вызывающие у бактерий:

- 1) нарушение биосинтеза пептидогликанов клеточной стенки (пенициллины, ванкомицин, цефалоспорины);
- 2) нарушение отдельных этапов процессов трансляции (амфениколы, аминогликозиды, тетрациклины, макролиды, линкосамиды);
- 3) повреждения цитоплазматической мембраны (грамицидин, полимиксины);
- 4) нарушение биосинтеза нуклеиновых кислот (рифамицины, актиномицин D, противоопухолевые антибиотики);
- 5) нарушение энергетического обмена (олигомицин, хлоргексидин).

Антибиотики широко используют в качестве молекулярных инструментов при исследовании фундаментальных проблем биологии, таких, как расшифровка тончайших механизмов биосинтеза белка, нуклеиновых кислот и структуры клеточных стенок бактерий, создание моделей транспорта ионов через биологические мембраны и др.

Изыскание новых антибиотиков обусловлено потребностями практики, а также накоплением резистентных форм микроорганизмов по отношению ко многим антибиотикам. Резистентность микроорганизмов может быть обусловлена снижением проницаемости оболочек клеток для антибиотиков, изменением пространственной структуры внутриклеточной мишени для них и деструкцией молекул антибиотиков под воздействием энзиматических систем организма. Устойчивость бактерий к пенициллинам и цефалоспорином создает присутствующий в их клетках энзим лактамаза (пенициллиназа). Фермент гидролизует амидную связь

$\beta$ -лактамного цикла в молекуле антибиотика с образованием пенициллиновой кислоты, которая полностью лишена антимикробной активности:



Специальное изучение объема и потенциала защитных свойств микроорганизмов показало, что их резистентность к антибиотикам имеет глобальный характер и обеспечивается как разнообразием фенотипов резистентности, так и разнообразием и стабильностью систем горизонтального генного транспорта. Поэтому главное направление получения новых антибиотиков состоит не в открытии новых соединений, а в химической трансформации природных молекул для создания полусинтетических антибиотиков, характеризующихся значительно меньшей резистентностью и токсичностью, но более широким спектром действия, большим временем жизни, химической и биологической устойчивостью. Важный подход на пути получения устойчивых аналогов антибиотиков — использование природных ингибиторов  $\beta$ -лактамаз — клавулановой и оливановой кислот. Стратегия борьбы с резистентностью к антибиотикам включает также последовательную замену одних препаратов другими с возобновлением применения через ограниченный срок «старых» препаратов антибиотиков. Удаление антибиотика из среды применения приводит к уменьшению распространенности генов резистентности к нему. После восстановления эффективности действия антибиотика его вновь вводят в клиническую практику.

Методы получения антибиотиков путем химического синтеза чрезвычайно сложны и не могут конкурировать с их биосинтезом методами биотехнологии. Существует несколько способов получения как природных, так и полусинтетических антибиотиков. Направленный биосинтез антибиотиков осуществляется путем прямой ферментации микроорганизма — продуцента с подходящим предшественником, что индуцирует синтез ферментов вторичного метаболизма в идиофазе. Точный механизм индуцирования первичными метаболитами генов, кодирующих синтез ферментов вторичного метаболизма, не расшифрован, однако выявлено, что молекулы предшественника необходимо добавлять в среду в период фазы роста микроорганизма. Установлено, что вво-

димый предшественник должен лимитировать скорость биосинтеза антибиотика. Например, производство бензилпенициллина в значительной степени стимулируется добавками его метаболического предшественника — фенилуксусной кислоты; пропионовая кислота и пропиловый спирт инициируют биосинтез макролидов через метилмалонилКоА; L-фенилаланин — предшественник фенилаланина — ускоряет образование грамицидина S. Аналогичный эффект вызывает использование ингибиторов метаболизма. Так, при подавлении процесса введения хлора микроорганизм *S. aureofaciens* образует тетрациклин, а не хлортетрациклин, а при ингибировании реакции метилирования им синтезируется деметилированное производное хлортетрациклина.

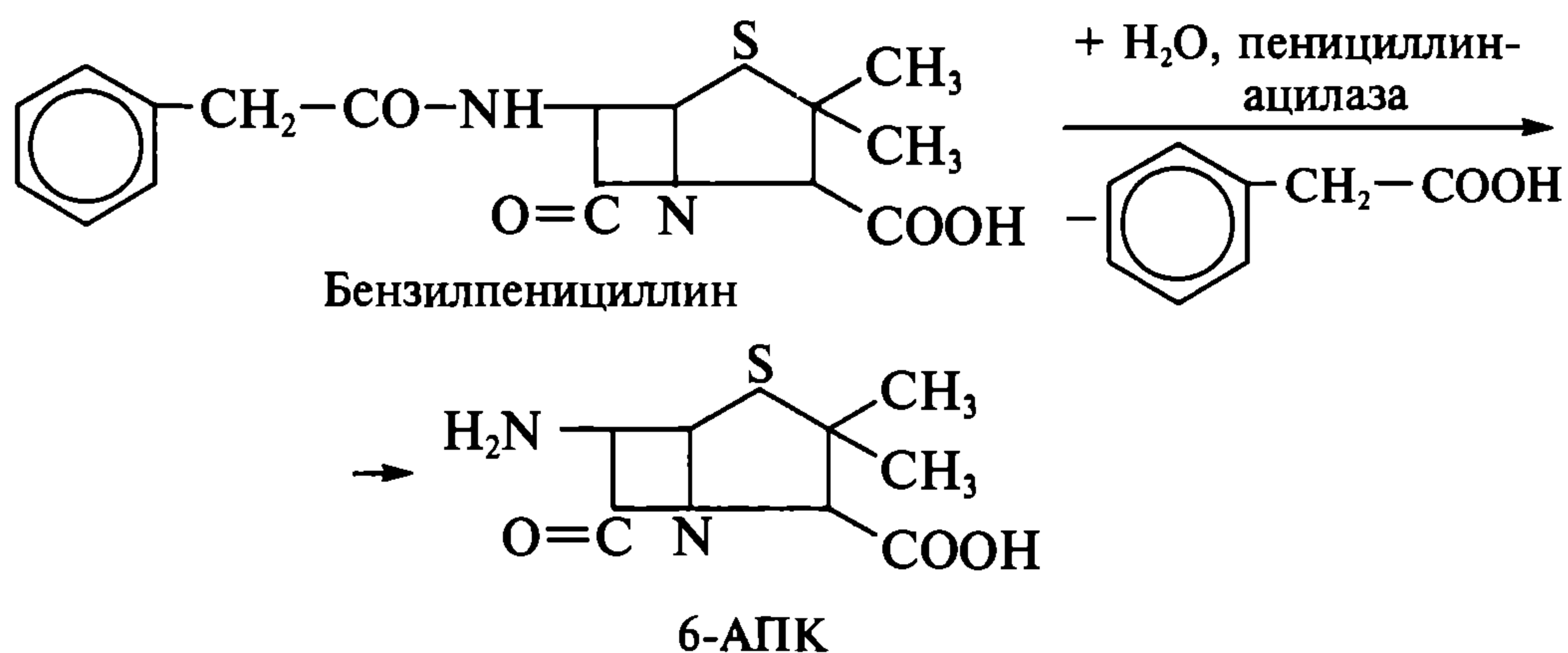
Другой способ получения антибиотиков состоит в использовании для их биосинтеза блокированных мутантов, у которых отсутствует (блокировано) определенное звено в цепи реакций, ведущих к синтезу антибиотика. Блокированные мутанты не способны образовывать нужный антибиотик. Используя низкую субстратную специфичность ферментов вторичного метаболизма и вводя аналоги предшественников антибиотика, последние переводят в аналоги самого антибиотика в ходе процесса, известного как мутационный биосинтез, или мутасинтез:

- а) предполагаемая последовательность реакций, ведущая к синтезу антибиотика
- $$A \longrightarrow B \xrightarrow{\text{фермент}} C \longrightarrow D \longrightarrow E \longrightarrow \text{антибиотик}$$
- б) отсутствие синтеза антибиотика у «блокированного» мутанта
- $$A \longrightarrow B \xrightarrow{\text{фермент}} \boxed{C \longrightarrow D}$$
- блокированное звено метаболизма
- в) синтез модифицированного антибиотика после введения аналога предшественника (D\*)
- $$A \longrightarrow B \xrightarrow{\text{фермент}} \dots D^* \longrightarrow E^* \longrightarrow \text{модифицированный антибиотик}$$

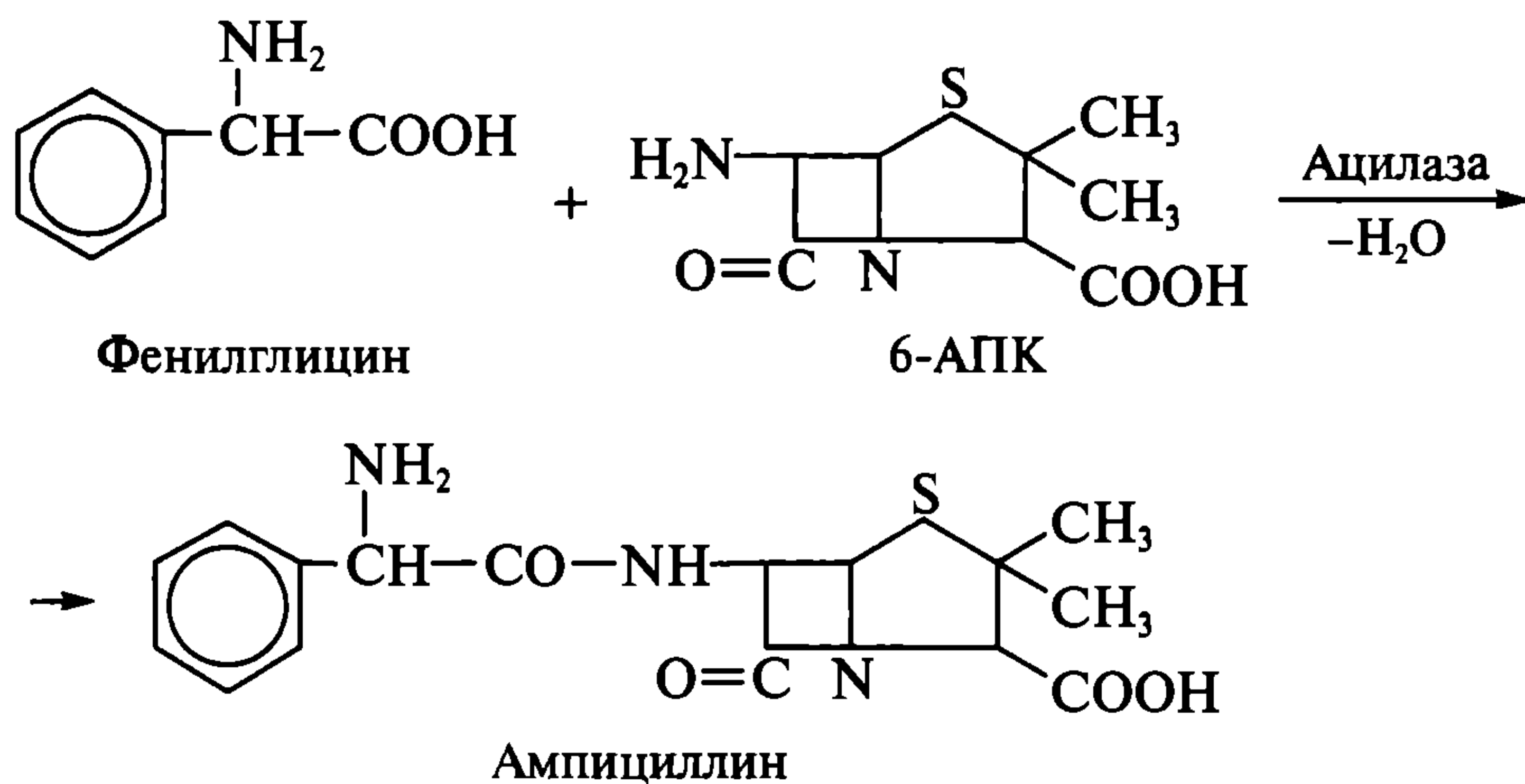
Так, мутанты *Nocardia mediterranei*, у которых нарушена способность к ацилированию, образуют аналог предшественника рифамицина В-рифамицин SV, который служит исходным веществом для получения многих синтетических рифамицинов (препараты для лечения туберкулеза и проказы).

Особенно успешны разработки в области биосинтеза полусинтетических пенициллинов и цефалоспоринов. Получение новых более эффективных аналогов пенициллина основано на изменении природы его ацильной группировки при сохранении в неизменном виде ядра пенициллина — 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК). В промышленности 6-АПК получают путем гидролиза природных пенициллинов с помощью специфического

фермента — пенициллинацилазы, образующейся с высоким выходом в процессе ферментации ряда штаммов микроорганизмов. Ацилазы различают по их субстратной специфичности. Некоторые из ацилаз способны катализировать и обратные реакции — процессы ацилирования аминогруппы 6-АПК с образованием модифицированного пенициллина. Таким путем было получено более 40 000 полусинтетических пенициллинов. Существенно, что во многих случаях 6-АПК не выделяют из культуральной жидкости, например при превращении бензилпенициллина в ампициллин:

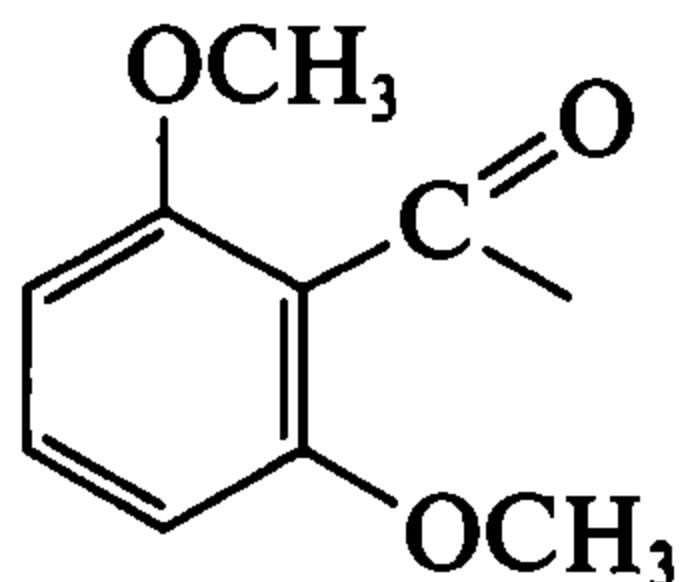


Бензилпенициллин гидролизуют ацилазой мутанта *Kluyvera citrophila* при pH 7,8 — 8,0 и температуре 40 — 50 °С. Затем в ферментер вносят мутант *Pseudomonas melanogenum* и фенилглицин. Условия ферментации изменяют таким образом (pH 5,0 — 5,5), чтобы ацилаза второго мутантного организма осуществляла синтез ампициллина:



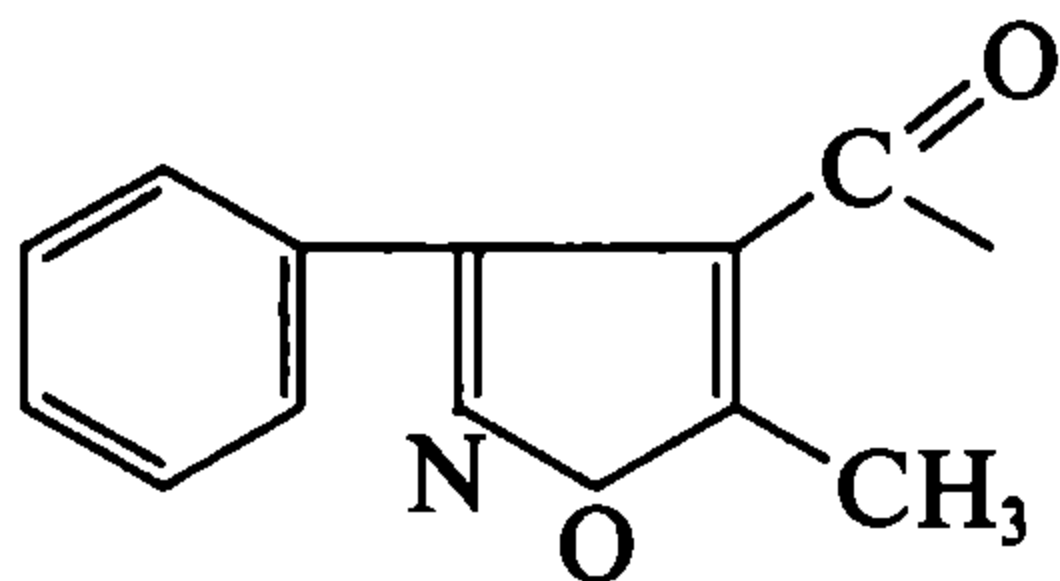
Замена ацильного остатка приводит к синтезу других полусинтетических антибиотиков. Так, если  $\text{RC}(=\text{O})$  в молекуле пе-

пенициллина представлен



, возникает метициллин,

а в случае ацила



— оксациллин.

Антибиотики продуцируются плесневыми грибами, актиномицетами, эубактериями и другими микроорганизмами. Некоторые из этих организмов способны продуцировать большое количество антибиотиков. Так, 6 родов филаментозных грибов производят около 1 000 различных антибиотиков, в том числе пенициллин и цефалоспорин, а три рода актиномицетов — 3 000 антибиотиков. Среди актиномицетов наибольший вклад вносит род *Streptomyces*, один из видов которого — *S. griseus* синтезирует более 50 антибиотиков. В процессе образования антибиотиков задействовано значительное число генов. Массовая расшифровка первичной структуры геномов микроорганизмов показала, что эта величина равна 1—2 %. Так, у *Bacillus subtilis* число таких генов достигает 2 %, что обеспечивает микроорганизму большие возможности для защиты и адаптации. С другой стороны, это обстоятельство затрудняет анализ путей биосинтеза антибиотиков и идентификацию отдельных мутаций, способных увеличить выход продукта. Тем не менее большинство известных в настоящее время высокопродуктивных штаммов продуцентов антибиотиков получено традиционными методами мутагенеза и селекции.

Биосинтез антибиотиков, как и любых других вторичных метаболитов, возрастает в фазе замедленного роста клеточной популяции (конец трофофазы) и достигает максимума в стационарной фазе (идиофазе). Считают, что в конце трофофазы изменяется ферментативный статус клеток, появляются индукторы вторичного метаболизма, освобождающие гены вторичного метаболизма из-под влияния катаболитной репрессии. Поэтому любые механизмы, тормозящие клеточную пролиферацию и активный рост, стрессовые ситуации, активируют процесс образования антибиотиков.

Процесс культивирования идиолитов проходит две фазы (двухступенчатое культивирование). На первой фазе происходит накопление достаточного количества биомассы, которая выращивается на среде для роста микроорганизма. Эта фаза должна быть



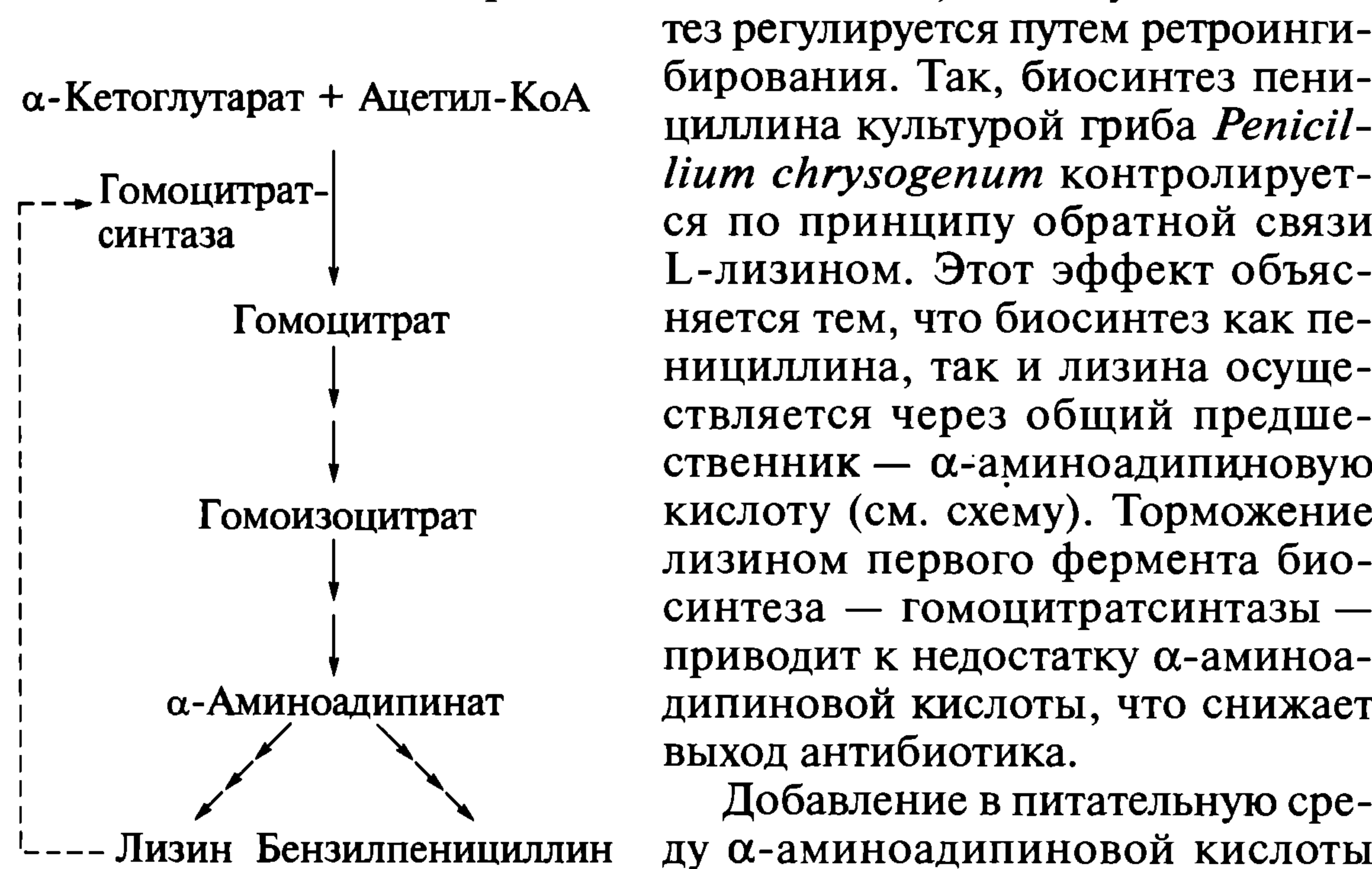
быстрой, а питательная среда дешевой. На второй фазе осуществляются запуск и активный синтез антибиотика. На этой фазе ферментацию ведут на продуктивной среде.

Образование антибиотиков регулируется условиями культивирования микроорганизмов. Поэтому оптимизация питательной среды является главным фактором в повышении выхода продукта.

Интенсивному биосинтезу антибиотика способствует уменьшение в культуральной среде легкоусвояемых источников углерода и азота (глюкозы, фруктозы, сахарозы, солей аммония). Использование в качестве компонентов питательных сред медленно утилизирующихся углеводов и белков (крахмала, лактозы, соевой и хлопковой муки, белково-витаминных концентратов и др.) повышает выход антибиотиков.

Специальные опыты показали, что выход цефалоспоринов уменьшается при переходе от использования в качестве источника углерода сахарозы к быстро усвояемому углеводу глюкозе. Наиболее оптимальной средой для образования антибиотика культурой *Streptomyces antibioticus* оказалась смесь 0,1 % глюкозы и 1 % галактозы. При таком соотношении моносахаридов глюкоза быстро утилизируется и микроорганизм переключается на усвоение галактозы, что и инициирует идиофазу. Высокая концентрация в среде фосфатов также непригодна для биосинтеза антибиотиков. Этот факт объясняется возрастанием в клетке содержания макроэргических соединений, что способствует повышению скорости роста продуцентов.

Многие антибиотики берут свое начало от промежуточных соединений обмена первичных метаболитов, поэтому их биосинтез регулируется путем ретроингибирования. Так, биосинтез пенициллина культурой гриба *Penicillium chrysogenum* контролируется по принципу обратной связи L-лизином. Этот эффект объясняется тем, что биосинтез как пенициллина, так и лизина осуществляется через общий предшественник —  $\alpha$ -аминоадипиновую кислоту (см. схему). Торможение лизином первого фермента биосинтеза — гомоцитратсинтазы — приводит к недостатку  $\alpha$ -аминоадипиновой кислоты, что снижает выход антибиотика.



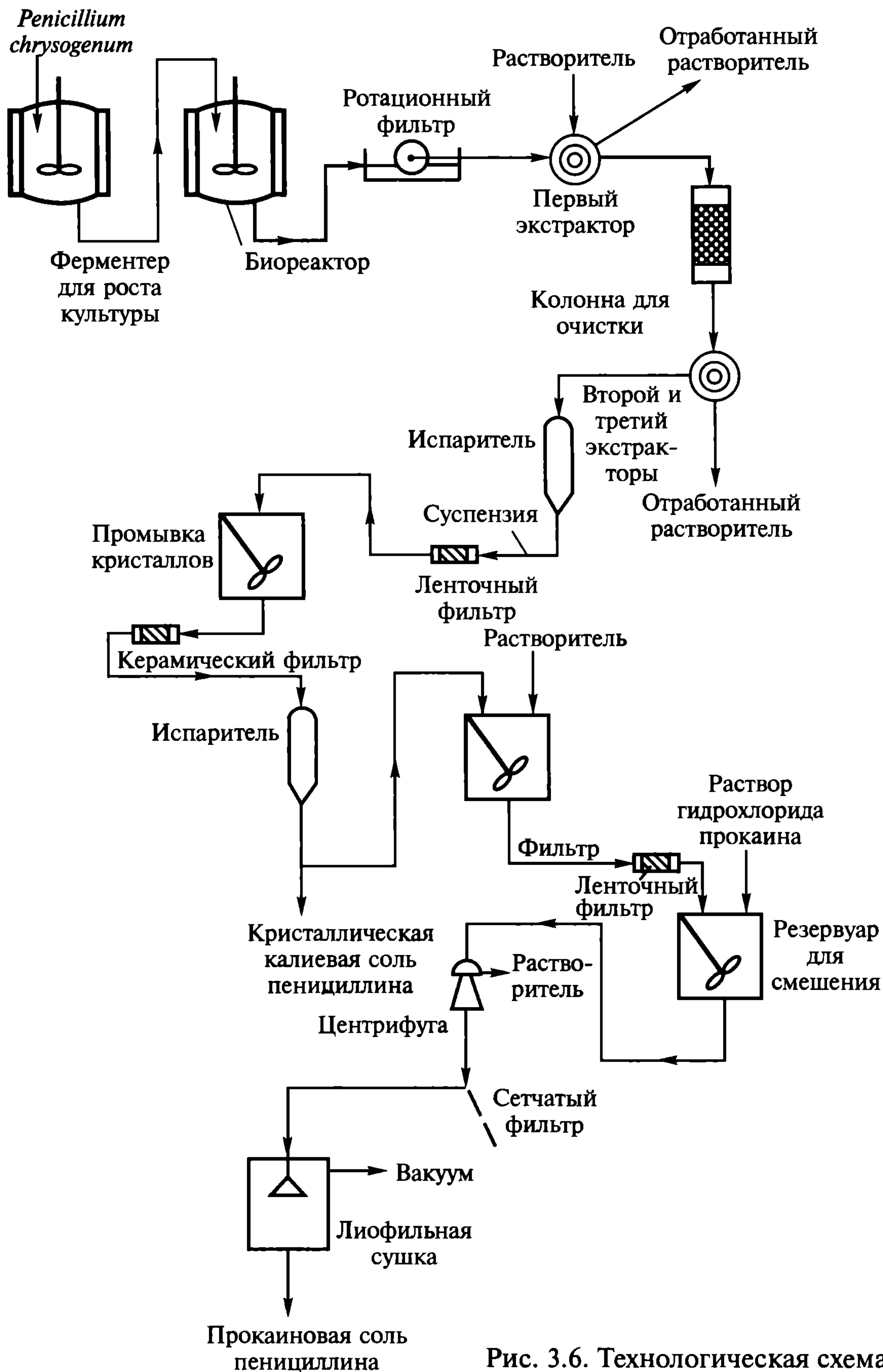


Рис. 3.6. Технологическая схема производства пенициллина (по В. Atkinson, F. Mavituna, 1983)

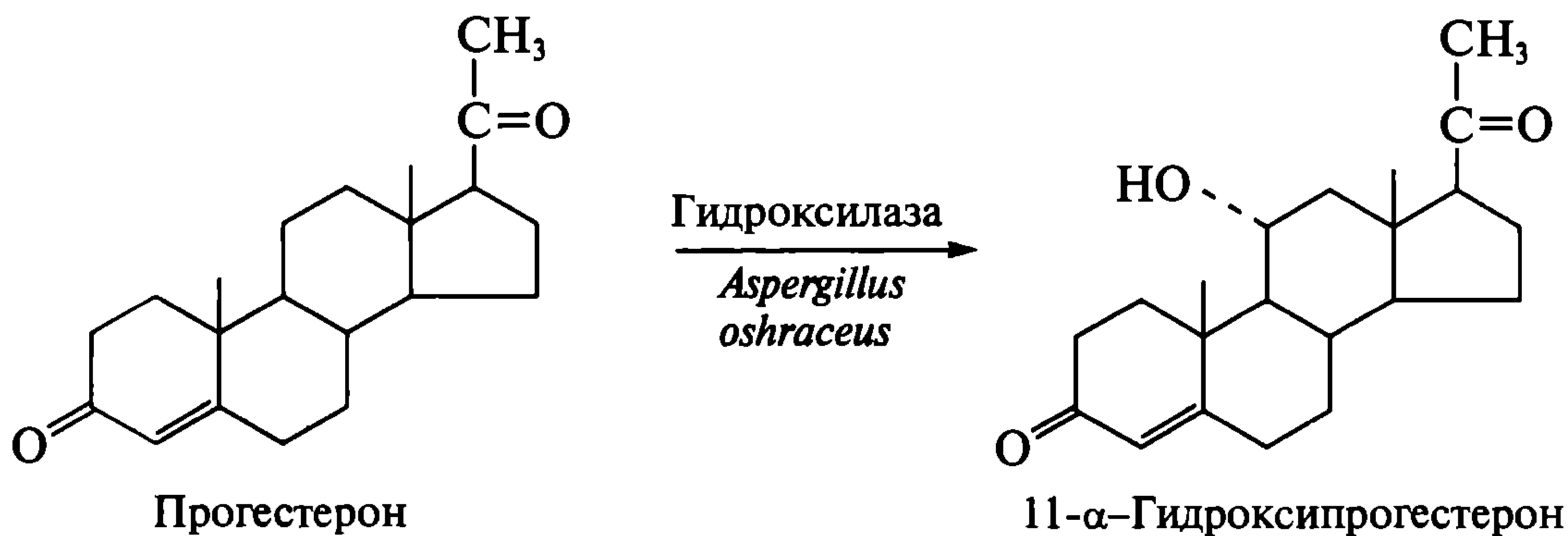
предотвращает ингибирующий эффект лизина и активирует биосинтез пенициллина в отсутствие лизина. Кроме ретроингибирования биосинтез многих антибиотиков тормозится высокими концентрациями своих же антибиотиков. Следует отметить, что в процессе эволюции микроорганизмы выработали механизмы защиты от действия собственных антибиотиков. Эта проблема успешно решается в результате использования иммобилизованных ферментов.

Большинство антибиотиков получают при глубинной аэробной ферментации периодического действия в асептических условиях. Период ферментации длится 7—10 суток. В последние годы внедряются полунепрерывные и непрерывные процессы ферментации. С помощью методов генетической инженерии удалось решить проблему увеличения эффективности использования кислорода культурой *Streptomyces*. В клетки микроорганизма был введен ген гемсодержащего белка аэробной бактерии *Vitreoscilla*. В результате трансформированные клетки *S. coelicolor*, растущие на среде с низким содержанием кислорода, синтезировали в 10 раз больше антибиотика актинородина в сравнении с нетрансформированными клетками. Технология завершающих стадий процесса определяется природой антибиотика, характером производства и целями дальнейшего использования антибиотиков. Для медицинских целей технология выделения и очистки имеет особое значение. Обычно она включает сложные многоступенчатые комбинации различных операций: экстракцию антибиотиков подходящими растворителями, осаждение и перекристаллизацию их из разных сред, фракционирование на ионообменных смолах, лиофильную и распылительную сушку готовых препаратов (рис. 3.6). Антибиотики выделяют или в виде сравнительно неочищенных препаратов (натриевая соль пенициллина), или в виде высокоочищенных веществ (прокаиновая соль пенициллина), предназначенных для клинического использования. Выход антибиотиков обычно составляет несколько десятков граммов на 1 л.

В последние годы, несмотря на трудности, связанные с необходимостью одновременного клонирования группы генов, которые обычно задействованы в биосинтезе одного антибиотика, достигнуты определенные успехи в получении новых антибиотиков генно-инженерными методами. Например, разработаны технологии переноса в клетки *E. coli* кластеров генов биосинтеза антибиотиков турбомицина А и В из некультивированных клеток. Перемещая те или иные участки ДНК и манипулируя таким образом доменами одного фермента (поликетидсинтазы), получены два новых ароматических поликетидных антибиотика.

### 3.4.2. Получение промышленно важных стероидов

Способность клеток микроорганизмов к сложнейшим процессам биотрансформации наиболее полно реализовалась при получении промышленно важных стероидов. Использование абсолютной субстратной специфичности и стереоспецифичности биологических катализаторов, присущих целым клеткам микроорганизмов, позволило разработать условия осуществления множества химических реакций для структурных перестроек стероидов. В результате были получены новые соединения с лучшими фармакологическими свойствами. Биотрансформация стероидов обычно заключается в селективном воздействии на одно из положений стероидного скелета. Первый промышленный процесс микробной биотрансформации стероидов основывался на технологии направленного гидроксилирования (11- $\alpha$ -гидроксилирование) прогестерона:

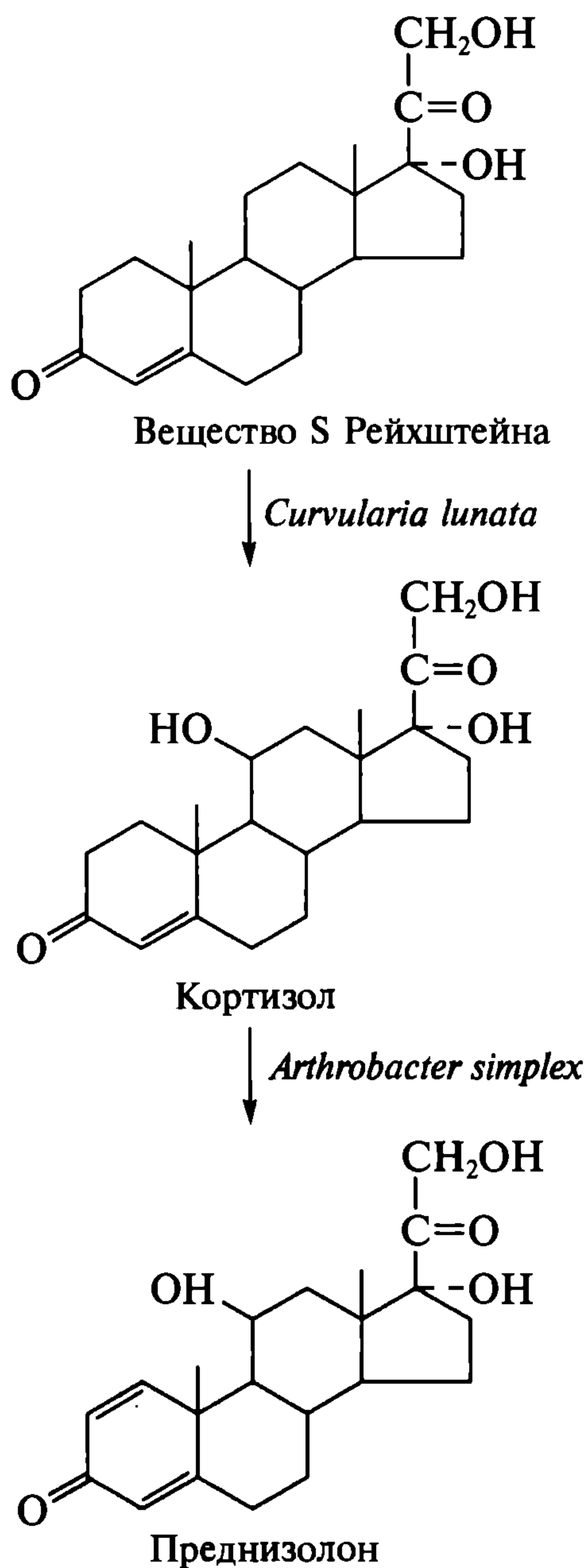


Значимость разработанной микробной трансформации определяется тем, что процессы гидроксилирования кортикостерона и его производных лежат в основе промышленного получения многих ценных продуктов: противовоспалительных и противоопухолевых препаратов, транквилизаторов, анестизирующих средств, половых гормонов и пр.

Так, производство в промышленном масштабе важнейшего противовоспалительного препарата — преднизолона — осуществляется путем микробного гидроксирования кортикостерона (см. схему, с. 76).

Правильность преобразования стероидного субстрата контролируют, сочетая химический подход со специфичностью биологической системы. Например, образование уксуснокислого эфира по С-17 субстрата стереохимически препятствует другим побочным реакциям.

Важнейший источник стероидных гормонов — культура клеток растений. Так, культура клеток диоскореи дельтовидной (*Dioscorea deltoidea*) корневого происхождения продуцирует фитостерин диосгенин и его гликозидные производные (сапонины).



Существенно, что способность к сверхсинтезу фураностаноловых гликозидов ряда штаммов диоскореи, например штамма ДМ-ОГ, стабильно поддерживалась в течение 27 лет (Р. Г. Бутенко, 1999). Таким образом, культивирование клеток растений *in vitro* представляет собой новое решение проблемы промышленного получения вторичных метаболитов.

Дальнейшие успехи в производстве стероидных препаратов связывают с применением иммобилизованных клеток, использованием оптимального сочетания биологических и химических превращений, а также с совершенствованием технологии очистки получаемых соединений. Среды для биотрансформации имеют достаточно сложный состав, а реакция требует строгого контроля за каждым ее параметром (рН, время и т. д.). Так, среда для осуществления реакции окисления кортизола в преднизолон культурой клеток *Arthrobacter simplex* включает пептон, глюкозу и кукурузный экстракт. Через сутки к смеси добавляют вещество S Рейхштейна. Процесс ведут строго в нейтральной среде при температуре 28 °С в течение 120 ч. Выход преднизолона составляет 93 %.

Разработка крупномасштабного производства преднизолона путем биотрансформации стероидов позволила снизить стоимость этого препарата в 200 раз.

Применение генно-инженерных подходов позволило оптимизировать процесс получения стероидов. Создан штамм *Saccharomyces cerevisiae*, способный синтезировать гидрокортизон при росте на глюкозе. В процессе конструирования штамма в клетки дрожжей были перенесены 6 генов животных, 2 гена человека и 2 гена растений. Созданный штамм дрожжей способен синтезировать до 17 г/л стероидов, из которых 70 % составляет гидрокортизон. Разработанный способ представляет собой пример одного из наиболее сложных случаев метаболической инженерии, организованной в микроорганизме *de novo*.

## БИОИНДУСТРИЯ ФЕРМЕНТОВ

Ферменты сохраняют свои уникальные свойства (эффективность, специфичность действия) вне клеток, поэтому их традиционно широко применяют в практике. Биологические катализаторы нетоксичны, работают в мягких условиях, используют доступное сырье (в том числе и отходы), в связи с чем их применение в промышленности выгодно с экономической и экологической точек зрения.

Внедрение биокаталитических технологий в практику определяется созданием безотходных и энергосберегающих производств, созданием новых принципов организации технологических процессов, улучшением здоровья и качества жизни человека.

### 4.1. ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ

По объему производства ферменты занимают третье место после аминокислот и антибиотиков. Из более чем 2 000 известных в настоящее время ферментов в промышленности используется около 30. Основная часть ферментов, поступающих на мировой рынок, приходится на долю гидролаз, из которых 60 % составляют пептидогидролазы (в основном щелочные и нейтральные протеазы), использующиеся в качестве детергентов в производстве синтетических моющих средств, а 30 % — гликозидазы, применяющиеся в производстве кондитерских изделий, фруктовых и овощных соков. Получены ферментные препараты целлюлаз,  $\beta$ -глюканаз,  $\alpha$ - и  $\beta$ -галактозидаз и других гидролаз для их использования в качестве кормовых добавок, при производстве пива и спирта для гидролиза некрахмальных полисахаридов, в текстильной промышленности для обработки тканей. Ферменты находят применение в текстильной, кожевенной, целлюлозно-бумажной, медицинской, химической промышленности (табл. 4.1).

По прогнозам ученых, основным потребителем ферментов в ближайшем будущем остается пищевая промышленность. Главное место среди этих энзимов занимают глюкоизомераза, глюкоамилаза и пектиназа, применяющиеся для приготовления обогащен-

## Применение ферментов

Название и шифр фермента	Источники фермента	Химический и биотехнологический процессы. Область использования
Амилазы (КФ 3.2.1.1 КФ 3.2.1.2 КФ 3.2.1.3)	Микроорганизмы: бактерии, грибы ( <i>Bacillus</i> sp., <i>Aspergillus niger</i> , <i>A.oryzae</i> )	Гидролиз крахмала до декстринов, мальтозы и глюкозы. Спиртовая, пивоваренная промышленность, хлебопечение, получение патоки, глюкозы
Глюкоизомераз (КФ 5.3.1.18)	Более 80 видов микроорганизмов ( <i>Bacillus</i> sp., <i>Streptomyces albus</i> , <i>S.griseus</i> )	Изомеризация D-глюкозы в D-фруктозу. Кондитерская, ликероводочная, безалкогольная промышленность, хлебопечение
Глюкооксидаза (КФ 1.1.3.4) и каталаза (КФ 1.11.1.6)	Микроорганизмы: бактерии, грибы ( <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>P.casei</i> , <i>P.nigricans</i> , <i>P.notatum</i> , <i>P.vitale</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Corynebacterium</i> ssp.)	Удаление кислорода и глюкозы (из яичного порошка, мясных и других продуктов). Виноделие, пивоваренная, консервная, соковая и безалкогольная промышленность
Липазы (КФ 3.1.1.3)	Поджелудочная железа животных, семена растений, микроорганизмы ( <i>Candida lipolytica</i> , <i>Streptomyces flavogriseus</i> , <i>Aspergillus</i> ssp., <i>Saccharomyces lipolytica</i> )	Гидролиз жиров и масел. Пищевая, легкая, медицинская промышленность, сельское хозяйство, коммунальное хозяйство, бытовая химия
Пектиназа (КФ 3.2.1.15)	Многие микроорганизмы ( <i>Aspergillus</i> ssp., <i>Fusarium</i> ssp., <i>Penicillium</i> ssp. и др.)	Гидролиз галактуронана, осветление вина и фруктовых соков
Пептидогидролазы (КФ 3.4)	Поджелудочная железа и слизистая желудка животных; плоды, побеги, отходы переработки некоторых растений (дынное дерево,	Лизис белка. Получение аминокислот, производство и получение сыра, мягчение мясных и рыбных изделий, выделка кожи. Активизация



Название и шифр фермента	Источники фермента	Химический и биотехнологический процессы. Область использования
	инжир, ананас), микроорганизмы ( <i>Bacillus</i> ssp., <i>Aspergillus</i> ssp., <i>Penicillium</i> ssp., <i>Streptomyces</i> ssp., <i>Pseudomonas</i> ssp.)	пищеварения. Пивоварение, виноделие, хлебопечение, пищевая промышленность, сельское хозяйство, медицина
Целлюлазы (КФ 3.2.1.4)	Микроорганизмы: бактерии, грибы ( <i>Clostridium</i> ssp., <i>Trichoderma reesei</i> , <i>T. viridae</i> , <i>Alternaria tenuis</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Geotrichum candidum</i> )	Гидролиз целлюлозы до глюкозы. Производство пищевых и кормовых белковых препаратов, этанола, глюкозофруктозных сиропов. Спиртовая, пивоваренная, пищевая концентратная промышленность, хлебопечение, кормопроизводство, деградация отходов
Фруктофуранозидаза (КФ 3.2.1.26)	Микроорганизмы: бактерии, грибы ( <i>Aspergillus</i> ssp., <i>Penicillium</i> ssp., <i>Fusarium</i> ssp., <i>Cercospora beticola</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Streptococcus mutans</i> )	Инверсия сахарозы. Кондитерская, ликероводочная, безалкогольная промышленность, сиропопроизводство

ных фруктозой кукурузных сиропов и составляющие около 50 % рынка пищевых энзиматических препаратов.

Все большее развитие получают технологические процессы с участием сложных энзиматических систем, включающих коферменты. Так, созданы ферментные мембранные реакторы, катализирующие непрерывные процессы с регенерацией НАДН (восстановительное аминирование кетокислот, восстановление  $\alpha$ -кетокислот в  $\alpha$ -гидроксикислоты). Разработаны системы разделения рацематов посредством стереоспецифического активного транспорта. Например, мембрана, содержащая гексокиназу и фосфатазу, функционирует как насос, избирательно прокачивающий лишь D-глюкозу. Применение сопряженных ферментативных ре-

акций с участием алкогольоксидазы и каталазы дрожжей *Hansenula polymorpha* и формальдегиддисмутазы бактерии *Pseudomonas putida* позволило осуществить окисление метанола в муравьиную кислоту с выходом 88 — 94 %. Благодаря развитию методов мицеллярной энзимологии в промышленности большое значение приобретают ферменты, способные катализировать химические реакции в органической фазе, в частности липазы. Существенно, что каталитическая активность панкреатической липазы свиньи сохраняется при концентрации воды в реакционной среде, составляющей всего 0,015 %, и при температуре 100 °С. Препараты липазы используют для синтеза оптически чистых сложных эфиров и феромонов, применяющихся в парфюмерии и медицине.

Большие возможности открывает использование биокаталитических технологий для осуществления процессов деградации экотоксикантов и биоремедиации загрязненных природных и техногенных сред. Ряд научных коллективов (МГУ им. М. В. Ломоносова, РХТУ им. Д. И. Менделеева и др.) разработали биопрепараты для биоремедиации нефтезагрязненных грунтов и водных поверхностей на территории России.

Для деградации и модификации антропогенных органических соединений, поступающих в окружающую среду, используют ферменты разных классов, в том числе лакказу, лигниназу, тирозиназу, монооксигеназу, диоксигеназу и др. Перспективна для очистки сточных вод новая технология, основанная на использовании реакции пластеинообразования, открытой А. Я. Данилевским еще в 1886 г. Сущность работ Данилевского состоит в экспериментальном доказательстве обращения протеолиза и возможности синтеза белковоподобных веществ (пластеинов) под действием ряда протеолитических ферментов. Сточные воды содержат аминокислоты и пептиды, концентрация которых возрастает в результате гидролиза белковых компонентов отходов под воздействием пептидогидролаз микроорганизмов. Данная технология, активно внедряющаяся во Франции, нацелена на производство в промышленных масштабах кормовых белков из аминокислот и пептидов сточных вод.

Важное направление исследования биокатализаторов — разработка новых экспресс-методов анализа и диагностики с помощью высокоизбирательных и чувствительных устройств, называемых биосенсорами. Биосенсоры на основе ферментов занимают сегодня лидирующее положение как среди научных аналитических разработок, так и среди коммерческих сенсорных систем. Они широко применяются для контроля уровня загрязнений окружающей среды и детекции токсинов, пестицидов, наркотических соединений, антибиотиков в биологических материалах и продуктах питания. Чувствительность таких датчиков варьирует в пределах 0,03 — 10 нг/мл.

Мощным стимулом к конструированию эффективных биосенсоров являются методы нанотехнологии, с помощью которых можно узнавать единичные биополимеры и живые клетки. Новое поколение биосенсоров, использующих сканирующую зондовую микроскопию и атомную силовую микроскопию, позволяет изучить морфологические, химические и физические параметры вирусов и фагов в целях их последующего детектирования.

Ферменты широко используют в медицине, например в заместительной терапии в составе лечебных препаратов. Пероральное введение фенилаланин-аммиак-лиазы снижает уровень фенилаланина в крови при фенилкетонурии. Протеолитические ферменты, амилазу и липазу применяют при заболеваниях желудочно-кишечного тракта и печени.

В последние годы накопились данные об эффективности применения протеиназ в энзимотерапии злокачественных новообразований. Это объясняется большей проницаемостью мембран раковых клеток для гидролитических ферментов в сравнении с нормальными клетками, благодаря чему опухолевые клетки быстро лизируются при введении смеси протеиназ (препарат «папайотин»).

Протеолитические ферменты плазмин и активирующие его стрептокиназу и урокиназу используют для растворения тромбов в кровеносных сосудах; коллагеназу — для рассасывания рубцовых образований; эластазу — для задержки развития атеросклероза; лизоцим — для лечения конъюнктивитов; дезоксирибонуклеазу из стрептококка (стрептодорназа) — для лечения заболеваний верхних дыхательных путей и роговицы глаза.

Важнейшую область применения ферментов в медицине составляет энзимодиагностика — тестирование патологии того или иного органа человека по уровню активности фермента или соотношению его множественных форм и изоферментов. Так, аспартатаминотрансфераза, изоцитратдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа и альдолаза служат для выявления инфаркта миокарда; аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза и лактатдегидрогеназа — для диагностики заболеваний печени; глутамилтрансфераза — для блокировки отторжения органов при их пересадке и т. д.

Таким образом, производство ферментных препаратов занимает одно из ведущих мест в современной биотехнологии и относится к тем ее отраслям, объем продукции которых постоянно растет, а сфера применения неуклонно расширяется. По объему производства ферментов доминируют страны Западной Европы. Резкий рост этой индустрии наблюдается в США и Японии.

## 4.2. ИСТОЧНИКИ ФЕРМЕНТОВ

Ферменты присущи всем живым существам, однако для их выделения используют те природные объекты, в которых содержание искомого энзима составляет не менее 1 %. Для крупномасштабного получения ферментов пригодны только некоторые растительные организмы на определенной фазе их развития (проросшее зерно различных злаков и бобовых, латекс и сок зеленой массы ряда растений), а также отдельные ткани и органы животных (поджелудочная железа, слизистая оболочка желудочно-кишечного тракта, сычуг крупного рогатого скота, семенники половозрелых животных). Практически неограниченный источник ферментов — микроорганизмы (бактерии, грибы, дрожжи), содержащие набор большинства известных в настоящее время энзимов, количество которых можно повысить в десятки и сотни раз методами мутагенеза, селекции и индукции биосинтеза.

## 4.3. ТЕХНОЛОГИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ – ПРОДУЦЕНТОВ ФЕРМЕНТОВ

В зависимости от источника технология получения ферментных препаратов имеет свои особенности. При извлечении ферментов из растительного сырья и животных тканей технология сводится к экстракции энзимов и очистке их от сопутствующих балластных веществ. Технология ферментных препаратов микробного происхождения более сложная, так как дополнительно включает этапы культивирования микроорганизмов — продуцентов ферментов, в том числе этапы получения посевного материала и производственной культуры соответствующего микроорганизма.

Для производства посевного материала используют исходный штамм продуцентов, получаемый из лабораторных чистых культур, который выращивают разными способами на предварительно стерилизованной твердой или жидкой питательной среде до определенного возраста. Посевной материал консервируют (высушиванием или хранением при низких температурах) вплоть до дальнейшего использования. Производственные культуры продуцента получают, выращивая посевной материал микроорганизмов как на поверхности твердых или жидких сред, так и в глубине жидких питательных сред.

**Поверхностный метод** выращивания продуцентов, предложенный И. Такаmine еще в 1894 г., состоит в культивировании микроорганизмов на поверхности увлажненных стерилизованных от-

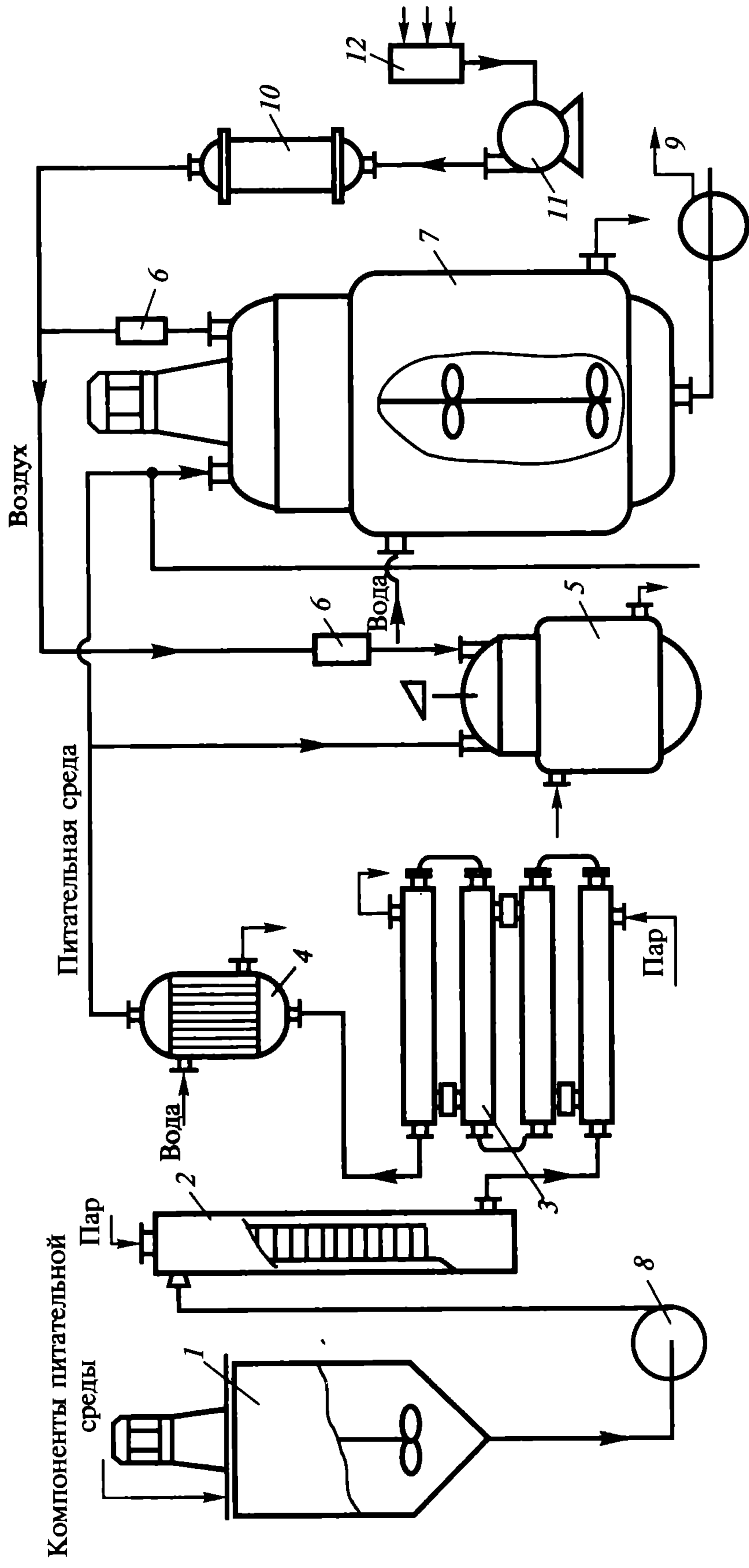


Рис. 4.1. Принципиальная технологическая схема глубинного культивирования микроорганизмов  
(по А.А. Свитцову и др., 1986):

1 — смеситель питательной среды; 2 — стерилизатор в непрерывном режиме потока питательной среды; 3, 4 — теплообменники; 5 — посевные аппараты; 6, 10, 12 — фильтры для очистки воздуха; 7 — ферментер; 8, 9 — насосы; 11 — компрессор

рубей, размещенных в кюветах, к которым иногда добавляют солодовые ростки, древесные опилки, свекловичный жом. Инкубацию микроорганизмов ведут в специальном термостатируемом цехе при постоянном контроле в нем температуры, влажности и подачи воздуха.

В последние 15 лет для выращивания продуцентов ферментов чаще используют более экономный метод — **глубинный метод** культивирования (рис. 4.1). В промышленных условиях для этого применяют ферментеры из нержавеющей стали, снабженные приспособлениями для перемешивания и подачи в жидкую питательную среду стерильного воздуха. Сначала ферментер заполняют питательной средой, автоклавируют, а затем засевают чистой культурой, подаваемой из специального генератора. Для предотвращения инфекции в ферментере поддерживают повышенное давление наряду с оптимальными значениями рН, температуры, редокс-потенциала и другими условиями культивирования.

В настоящее время наиболее прогрессивным признан **проточный метод** культивирования микроорганизмов, который обеспечивает непрерывную подачу в ферментер как питательной среды, так и посевного материала. Размножение микроорганизмов и биосинтез фермента регулируют при использовании этого метода по мере поступления питательной смеси в ферментер. Такой ферментер представляет собой вращающийся трубкообразный реактор, через один конец которого в него поступает питательная среда и культура микроорганизмов, а из другого — выводятся ферменты, продукты жизнедеятельности и бактериальная масса. Основное достоинство метода — возможность длительное время поддерживать в автоматическом режиме рост культуры микроорганизма. Например, культура ацетонобутиловых бактерий находилась в таком реакторе в состоянии непрерывного размножения в течение 200 суток (И. Д. Иерусалимский с сотр., 1986).

Важнейшим фактором эффективности технологии ферментных препаратов является качество питательной среды. Основное требование к качеству питательной среды состоит в полноценности ее состава, обеспечивающей рост продуцента и биосинтез целевого фермента. Микроорганизмы нуждаются прежде всего в соединениях, содержащих углерод, азот, водород и кислород. К ним относятся органические вещества, соли аммония и вода. Кроме того, в состав питательной среды должны быть включены минеральные соединения, содержащие Mg, Ca, P, S, Fe, K и другие макро- и микроэлементы, витамины, ростовые вещества (биотин, инозит) и пр. Питательные среды в зависимости от состава делятся на синтетические и комплексные. Синтетическими считают те среды, которые состоят из определенного по качественному и

количественному составу набора индивидуальных веществ. В комплексные среды входят различные природные продукты, часто отходы пищевых производств. К их числу относятся различные жмыхи, барда спиртовых заводов, картофельная мезга, кукурузный экстракт, меласса, отруби и прочие продукты. Благодаря использованию отходов комплексные питательные среды доступны, дешевы и обеспечивают безотходность биотехнологических производств.

#### **4.4. ТЕХНОЛОГИЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

Выделение и очистка фермента как из культуры микроорганизма (выращенного любым способом), так и из других природных источников весьма трудоемкая и дорогостоящая процедура, поэтому если фермент можно использовать в виде неочищенного препарата, его не очищают. В промышленности широко применяют коммерческие препараты ферментов, чистота которых составляет всего 0,1 % (т.е. 99,9 % составляют примеси). К таким отраслям относятся спиртовая, кожевенная, текстильная промышленность, а также сельское хозяйство, производство бытовой химии. Например, ферментный препарат, употребляемый в пивоварении, представляет собой высушенную биомассу плесневых грибов. В большинстве отраслей пищевой промышленности, практике научных исследований и особенно в медицине используют только очищенные препараты ферментов, частично или полностью освобожденные от балластных веществ и полностью охарактеризованные в отношении их специфичности и физико-химических свойств. Исходным материалом для получения препаратов ферментов служат: биомасса продуцента, фильтрат культуральной жидкости, экстракт из культуры микроорганизма или из тканей и органов растений и животных, из которых готовят препараты различной степени очистки.

Неочищенные ферментные препараты получают путем высушивания в мягком режиме культуры микроорганизмов вместе с остатками питательной среды. Такие препараты получают и путем упаривания экстракта из культуры продуцента, выращенного поверхностным способом, или из фильтрата культуральной жидкости (в случае глубинного выращивания микроорганизмов). Распространен также метод ацетоновых порошков, состоящий в осаждении и быстром обезвоживании при температуре не выше  $-10^{\circ}\text{C}$  тканей или вытяжек из них, содержащих ферменты. Технические препараты ферментов представляют собой либо высу-



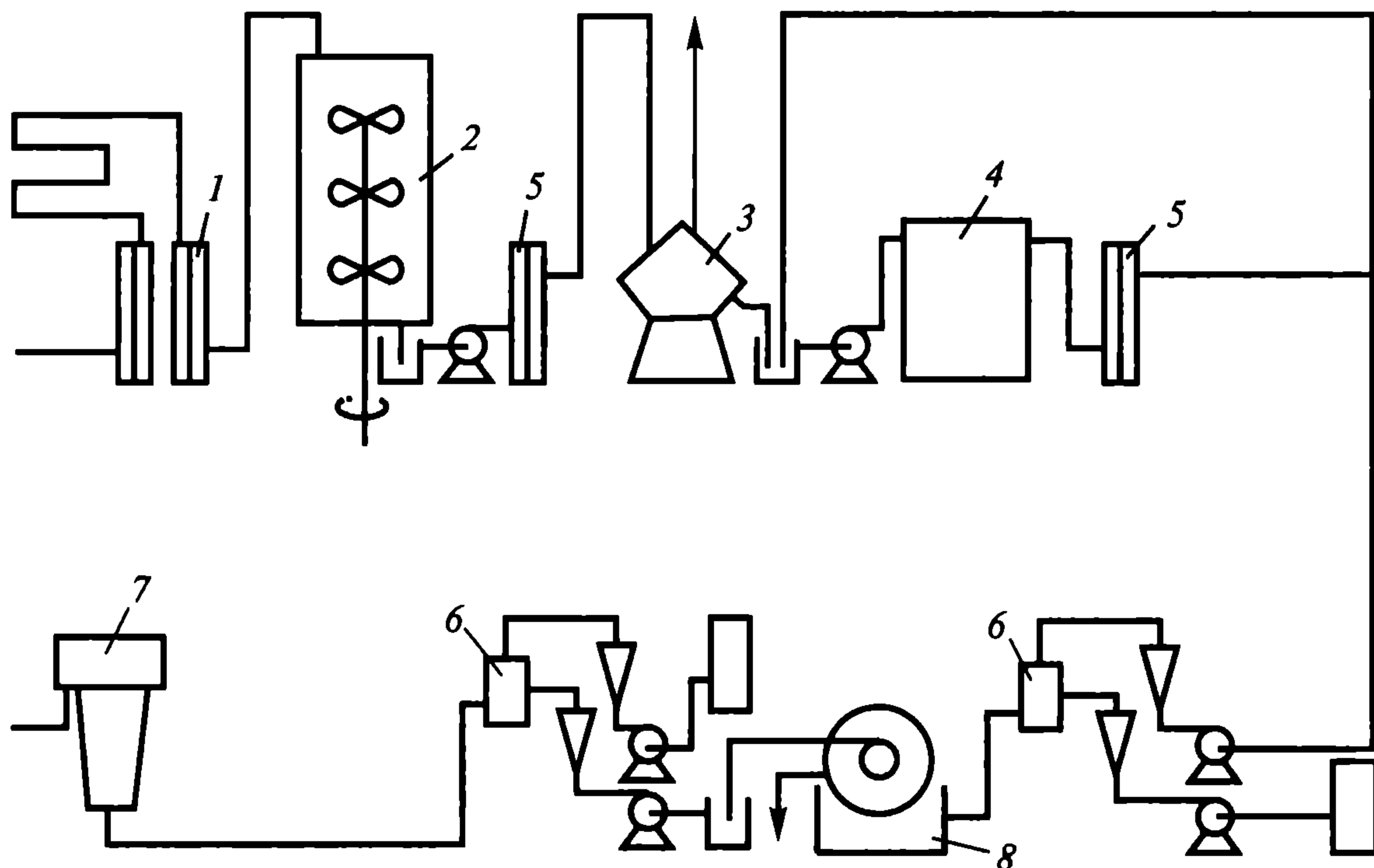


Рис. 4.2. Технологическая схема непрерывного получения  $\beta$ -галактозидазы из клеток *E. coli* ML308 (по P. P. Gray et al., 1972):

1 — стерилизатор среды; 2 — ферментер; 3, 7 — центрифуги; 4 — гомогенизатор; 5 — теплообменник; 6 — смесительные камеры; 8 — ротационный вакуум-фильтр

шенные до порошкообразного состояния продукты, либо жидкие концентраты, обычно характеризующиеся 50%-м содержанием сухой массы веществ.

Для успешного выделения ферментов из клеточного содержимого необходимо очень тонкое измельчение исходного материала вплоть до разрушения субклеточных структур: лизосом, митохондрий, ядер и др., которые имеют в своем составе многие индивидуальные ферменты. Для этого используют специальные мельницы и гомогенизаторы, а также ультразвук, метод попеременного замораживания и оттаивания ткани. Для высвобождения ферментов из мембранных структур клетки к гомогенатам добавляют небольшие количества детергентов (твин, тритон X-100) или обрабатывают их энзимами — лизоцимом, целлюлазой, лецитиназой С. Особое внимание при выделении ферментов уделяют проведению всех операций в условиях, исключающих денатурацию белка (нейтральные значения pH, стабилизирующие добавки в виде белков, солей и специальных соединений).

Пример, иллюстрирующий получение частично очищенного препарата  $\beta$ -галактозидазы из мутанта *E. coli*, представлен на рис. 4.2. Схема очистки включает отделение клеток микроорганизма

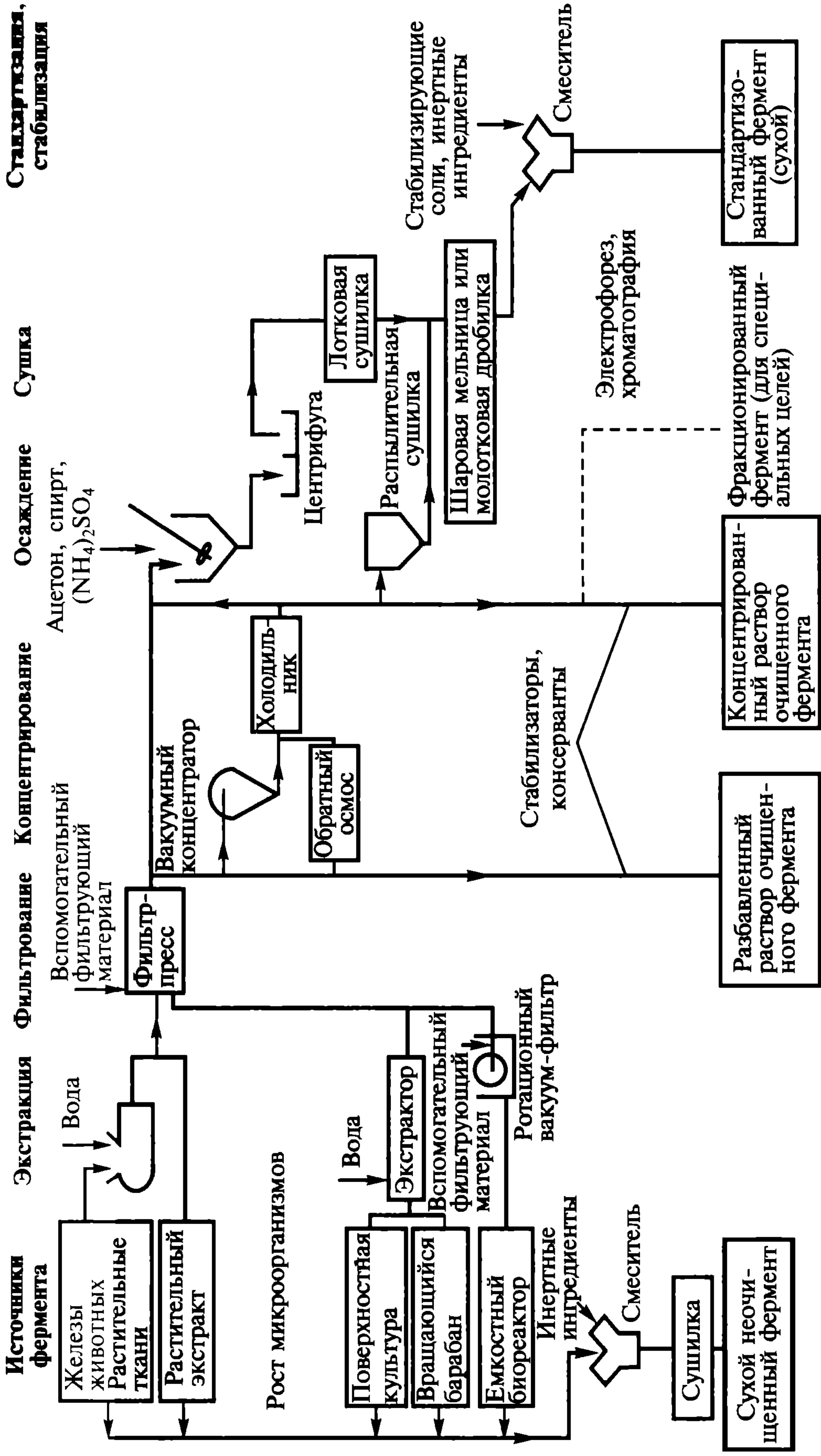


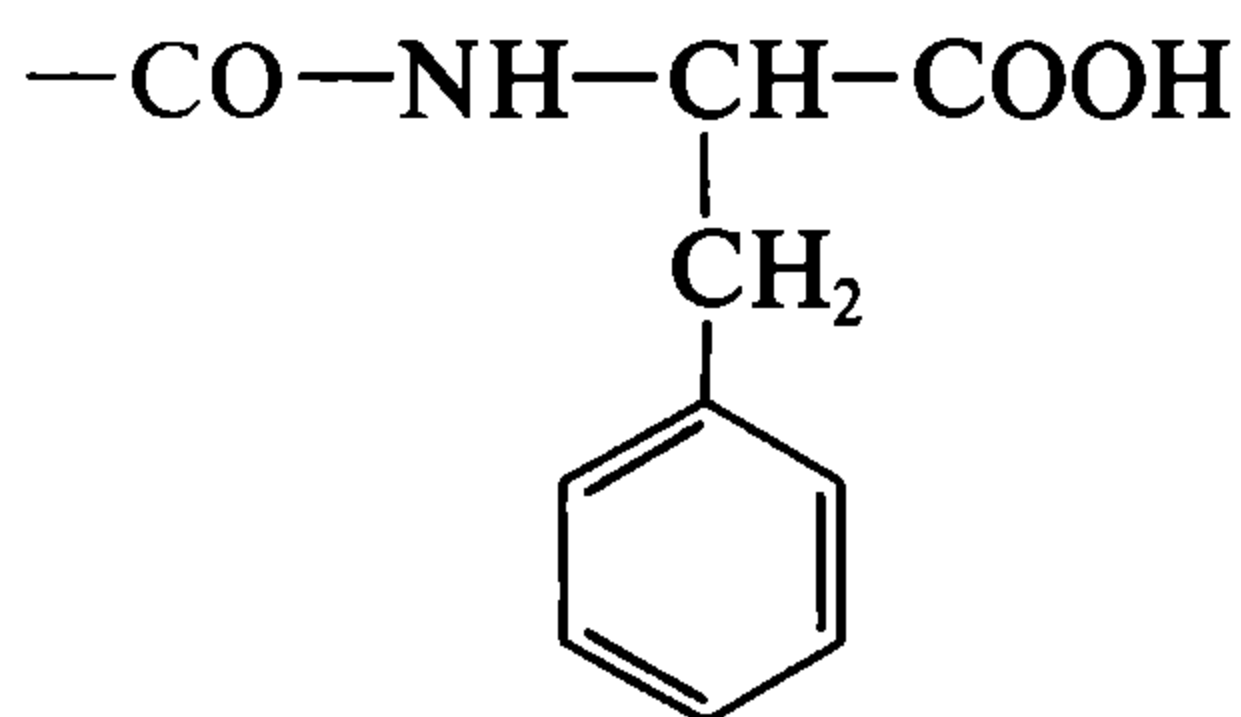
Рис. 4.3. Схема получения ферментных препаратов из культур микроорганизмов (по Дж. Бейли, Д. Оллис, 1989)

по выходе их из ферментера от культуральной жидкости посредством центрифугирования и последующее разрушение клеток в гомогенизаторе высокого давления. Для освобождения белков от нуклеиновых кислот полученный гомогенат обрабатывают сульфатом марганца до конечной концентрации этой соли в смеси, равной 0,05 М. Осадок нуклеиновых кислот отделяется с помощью ротационной вакуум-фильтрации, а в образовавшийся фильтрат добавляют сульфат аммония до 45 % от его насыщения. Возникший осадок белков, содержащий  $\beta$ -галактозидазу, собирают с помощью центрифугирования или вакуум-фильтрации. Вся процедура очистки энзима от момента подачи бактерий в систему до момента получения осадка  $\beta$ -галактозидазы занимает всего 1 ч.

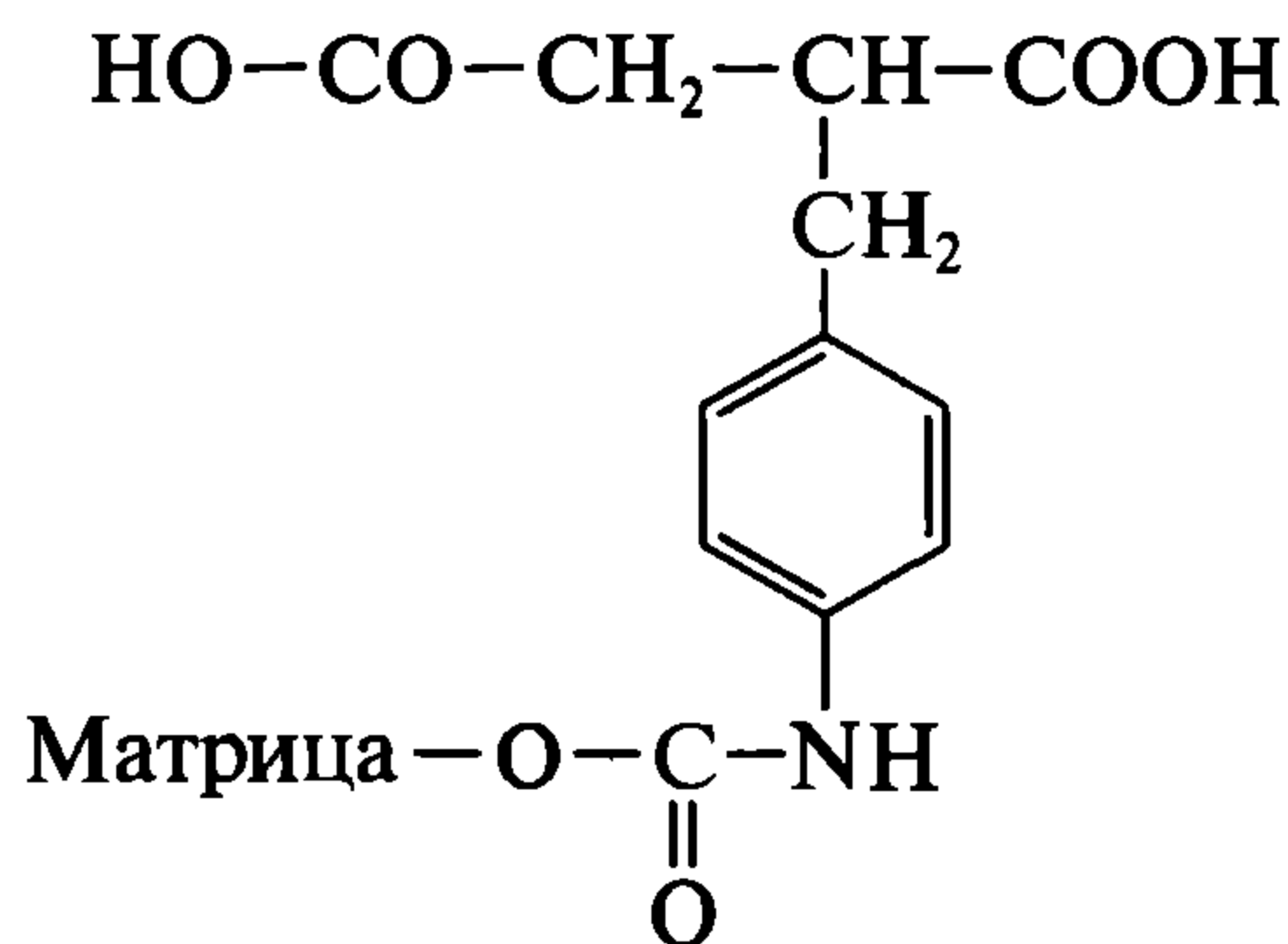
В зависимости от свойств выделяемого фермента и сопутствующих ему балластных веществ при получении очищенных препаратов ферментов комбинируют различные приемы и методы (рис. 4.3), такие, как термическое фракционирование, осаждение органическими растворителями, солями и тяжелыми металлами, фильтрация на молекулярных ситах, ионообменная хроматография, электрофорез, изоэлектрофокусирование.

На заключительных этапах очистки часто используют аффинную хроматографию (биоспецифическая хроматография, хроматография по сродству), которая основана на способности ферментов избирательно связывать те или иные лиганды — субстраты, коферменты, конкурентные ингибиторы, аллостерические эффекторы и т.п. Такое связывание весьма специфично ( $K_s < 10^{-4}$  М), что позволяет выделить тот или иной энзим из множества других белков. Например, из желудочного сока человека методом одноэтапной аффинной хроматографии выделена кислая липаза, используемая в заместительной терапии при заболеваниях печени.

Для синтеза аффинного сорбента, соответствующего специфичности данного фермента, лиганд (субстрат или его аналог) присоединяют к инертной матрице (макропористые гидрофильные гели, синтетические полимеры, неорганические носители). Для уменьшения пространственных трудностей при взаимодействии фермента с матрицей лиганд присоединяют к носителю через промежуточное звено (вставку, ножку, спейсер). Присоединение лигандов к поперечношшитой агарозе — сефарозе обычно проводят, активируя ее бромцианом (см. с. 89). Связывание с сефарозой, активированной бромцианом, *n*-амино-бензилянтарной кислоты, используемой в качестве лиганда, обеспечивает взаимодействие сорбента с каталитическим центром только карбокси-пептидаз благодаря сходству лиганда с субстратами карбокси-пептидазы:

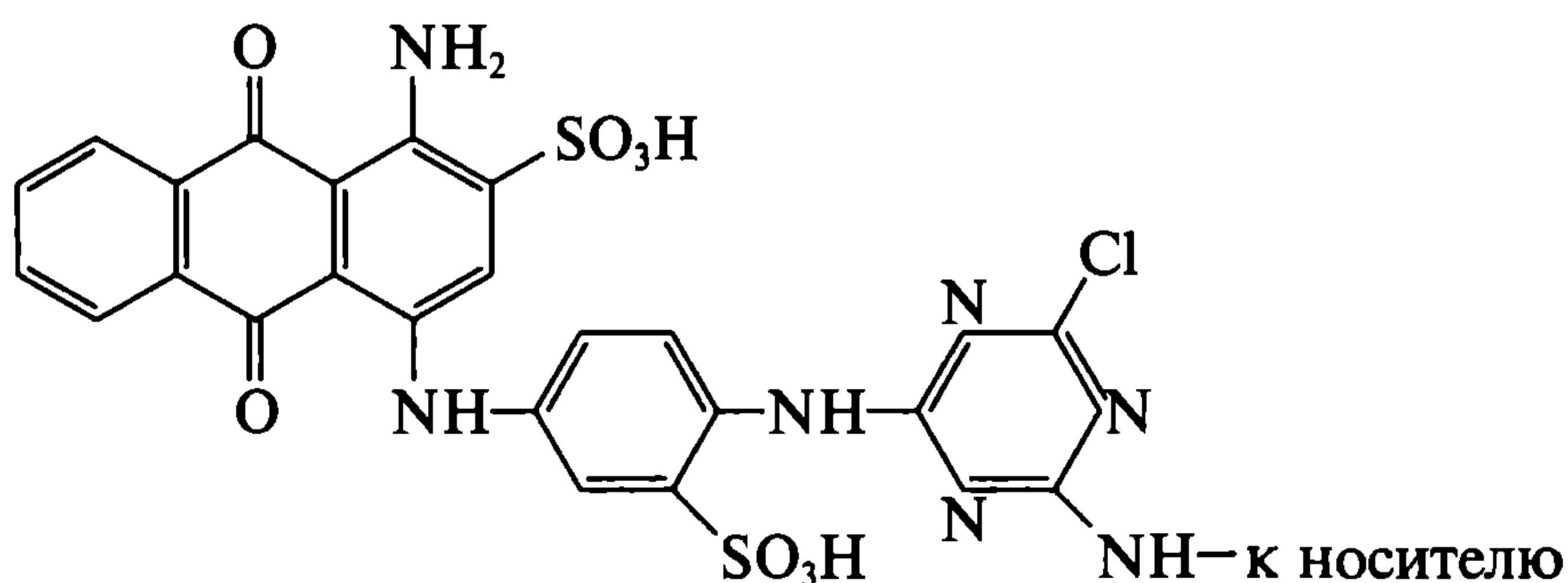


С-концевой остаток  
фенилаланина в субстрате  
карбоксипептидазы



Аффинный сорбент с лигандом.  
Бензилянтарная кислота изостерична  
структуре остатка фенилаланина

Сорбенты, содержащие цибакрон голубой и некоторые другие красители антрахинонового ряда, используют для аффинной хроматографии НАД-зависимых дегидрогеназ, а носители, имеющие циклопептидный антибиотик грамицидин, — для протеолитических ферментов:



Аффинный сорбент, содержащий антрахиноновый краситель

В процессе выделения повышается доля фермента в массе тотальных белков, т. е. увеличивается его удельная активность. В табл. 4.2 представлены данные, характеризующие процедуру очистки от сопутствующих ферментов и балластных белков глюкоамилазы из культуры *Endomycopsis* ssp. 20-9. Анализ таблицы показывает, что чистота глюкоамилазы в препарате возросла в 37 раз и в полученном препарате отсутствует активность двух ферментов углеводного обмена — гликозилтрансферазы и  $\alpha$ -амилазы.

В производственных условиях активность получаемого ферментного препарата оценивается количеством субстрата, преобразованного 1 мг (1кг) препарата при оптимальных условиях за 1 мин, и измеряется в Е/мг, моль/мг или каталах/кг белка.

Очищенные ферментные препараты хранят при низкой температуре (до  $-80^\circ\text{C}$ ). Для стабилизации ферментов в их препараты добавляют коферменты и субстраты. Ферментные препараты для промышленного применения стабилизируют, добавляя глицерин,

Схема очистки глюкоамилазы из культуры *Endomycopsis spp.* 20-9 (по И.М.Грачевой, 1987)

Стадия очистки	Объем, мл	Общее количество белка, мг	Глюкоамилазная активность				Амилолитическая активность		Транс- глюкози- дазная актив- ность
			общая, ед. (Е)	удельная, Е/мг	выход, %	степень очистки	общая, ед. (Е)	выход, %	
Исходная культураль- ная жидкость	1 200	13 600	28 500	2,1	100,0	1,0	9 500	100	Глюкоза, изомаль- тоза
Отделение биомассы, концентрирование, отделение балласта	560	11 100	25 600	2,3	90,0	1,1	8 500	89,0	То же
Осаждение ацетоном, растворение в воде	350	2 040	19 800	9,7	69,5	4,6	1 050	11,3	—
Ультрафильтрация	55	1 610	18 200	11,3	64,0	5,4	860	9,10	—
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	555	298	15 000	50,4	52,5	24,5	30,0	0,35	—
Ультрафильтрация	16	250	13 450	54,0	47,2	25,7	27,5	0,29	—
Гель-фильтрирование через акрилекс П-100	100	140	11 400	76,5	40,5	36,5	22,8	0,24	—
Обессоливание, лио- филизация	0,1	92	7 150	77,0	25,0	37,0	14,3	0,15	—

моносахариды, дисахариды (глюкоза, сахароза, лактоза), HS-соединения (цистеин, глутатион, меркаптоэтанол, дитиотреитол и др.), отдельные аминокислоты, желатину и другие белки-наполнители.

Существенно, что из 2003 включенных в список известных в настоящее время ферментов более 1 500 выделено и в той или иной степени очищено; это служит не только базой для изучения физико-химических основ ферментативного катализа, но и фундаментом для совершенствования химического производства и промышленности.

## 4.5. ИНЖЕНЕРНАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ, ЕЕ ЗАДАЧИ

Развитие прикладной энзимологии долгое время сдерживалось дороговизной чистых ферментных препаратов, неустойчивостью их при хранении и невозможностью многократного использования. Принципиально новые перспективы открылись перед прикладной энзимологией в 60-е годы XX в. в результате появления на стыке химии и биологии новой отрасли — инженерной энзимологии. Ее задачи заключаются в развитии прогрессивных методов выделения ферментов, их стабилизации и иммобилизации; конструировании катализаторов с нужными свойствами и разработке научных основ их применения.

В частности, методами белковой инженерии, сущность которых состоит в изменении первичной структуры природной молекулы фермента посредством химической модификации самого энзима или его гена, удастся принципиально трансформировать структуру активного центра и его функцию, модулировать субстратную специфичность и физико-химические свойства фермента. Так, замена остатка глутамина-102 в молекуле лактатдегидрогеназы на аргинин превратила фермент в высокоактивную малатдегидрогеназу. Описанным способом получены термостабильные формы лизоцима Т-4 и субтилизина (каталитическая константа субтилизина изменена в 100 раз), созданы гибридные формы ферментной системы, ценной в иммуноферментном анализе, сочетающие в себе свойства  $\beta$ -галактозидазы и  $\beta$ -галактокиназы.

Многие проблемы технологии синтеза органических соединений, пищевой и медицинской промышленности, мониторинга человека и окружающей среды, защиты окружающей среды, энергетики не могут быть решены без использования методов современной инженерной энзимологии.

Важным этапом развития инженерной энзимологии стала разработка способов получения и использования иммобилизованных ферментов.

## 4.6. ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ФЕРМЕНТЫ

Имобилизованными ферментами называются ферменты, искусственно связанные с нерастворимым носителем, но сохраняющие свои каталитические свойства.

Еще в 1916 г. Дж. Нельсон и Е. Гриффин показали, что сахароза, сорбированная на угле, сохраняла свою каталитическую активность, но лишь в 1953 г. Н. Грубхофер и Д. Шлейт впервые осуществили ковалентные связывания амилазы, пепсина, РНКазы и карбоксипептидазы с нерастворимым носителем.

В 1971 г. на первой конференции по инженерной энзимологии был узаконен термин «иммобилизованные ферменты». Однако в понятие «иммобилизация» в настоящее время вкладывают более широкий смысл, чем связывание на нерастворимом носителе, а именно — полное или частичное ограничение свободы движения белковых молекул.

Имобилизованные ферменты имеют ряд преимуществ в сравнении со свободными молекулами. Прежде всего такие ферменты, представляя собой гетерогенные катализаторы, легко отделяются от реакционной среды, могут использоваться многократно и обеспечивают непрерывность каталитического процесса. Кроме того, иммобилизация ведет к изменению свойств фермента: субстратной специфичности, устойчивости, зависимости активности от параметров среды. Имобилизованные ферменты долговечны и в тысячи и десятки тысяч раз стабильнее свободных энзимов. Так, происходящая при температуре 65 °С термоинактивация лактатдегидрогеназы, иммобилизованной в 60 %-м полиакриламидном геле, замедлена в 3 600 раз по сравнению с нативным ферментом.

Все перечисленное обеспечивает высокую экономичность, эффективность и конкурентоспособность технологий, использующих иммобилизованные ферменты.

### 4.6.1. Носители для иммобилизации ферментов

По Дж. Порату (1974), идеальные материалы, используемые для иммобилизации ферментов, должны обладать следующими основными свойствами: нерастворимостью; высокой химической и биологической стойкостью; значительной гидрофильностью; достаточной проницаемостью как для ферментов, так и для коферментов, субстратов и продуктов реакции; способностью носителя легко активироваться (переходить в реакционноспособную форму).



Естественно, ни один из используемых в настоящее время в качестве носителя материал не отвечает полностью перечисленным требованиям. Тем не менее существует широкий набор носителей, пригодных для иммобилизации определенных энзимов в конкретных условиях.

В зависимости от природы носители делятся на органические и неорганические материалы.

**Органические полимерные носители.** Иммобилизация многих ферментов осуществляется на полимерных носителях органической природы. Существующие органические полимерные носители можно разделить на два класса: природные и синтетические полимерные носители. В свою очередь, каждый из классов органических полимерных носителей подразделяется на группы в зависимости от их строения. Среди природных полимеров выделяют белковые, полисахаридные и липидные носители, а среди синтетических — полиметиленовые, полиамидные и полиэфирные.

К преимуществам природных носителей следует отнести их доступность, полифункциональность и гидрофильность, а к недостаткам — биodeградируемость и достаточно высокую стоимость.

Из полисахаридов для иммобилизации наиболее часто используют целлюлозу, декстран, агарозу и их производные. Для придания химической устойчивости линейные цепи целлюлозы и декстрана поперечно сшивают эпихлоргидрином. В полученные сетчатые структуры довольно легко вводят различные ионогенные группировки. Химической модификацией крахмала сшивающими агентами (формальдегид, глиоксаль, глутаровый альдегид) синтезирован новый носитель — губчатый крахмал, обладающий повышенной устойчивостью к гликозидазам.

Из природных аминосахаридов в качестве носителей для иммобилизации применяют хитин, который в значительных количествах накапливается в виде отходов в процессе промышленной переработки крабов и креветок. Хитин химически стоек и имеет хорошо выраженную пористую структуру.

Среди белков практическое применение в качестве носителей нашли структурные протеины, такие, как кератин, фиброин, коллаген и продукт переработки коллагена — желатина. Эти белки широко распространены в природе, поэтому доступны в значительных количествах, дешевы и имеют большое число функциональных групп для связывания фермента. Белки способны к биodeградации, что очень важно при конструировании иммобилизованных ферментов для медицинских целей. К недостаткам белков как носителей в этом случае следует отнести их высокую иммуногенность.

**Синтетические полимерные носители.** Благодаря разнообразию и доступности материалы этой группы широко используются как носители для иммобилизации. К ним относятся полимеры на основе стирола, акриловой кислоты, поливинилового спирта; полиамидные и полиуретановые полимеры. Большинство синтетических полимерных носителей обладают механической прочностью, а при образовании обеспечивают возможность варьирования в широких пределах величины пор, введения различных функциональных групп. Некоторые синтетические полимеры могут быть произведены в различных физических формах (трубы, волокна, гранулы). Все эти свойства полезны для разных способов иммобилизации ферментов.

**Носители неорганической природы.** В качестве носителей наиболее часто применяют материалы из стекла, глины, керамики, графитовой сажи, силикагеля, а также силихромы, оксиды металлов. Их можно подвергать химической модификации, для чего носители покрывают пленкой оксидов алюминия, титана, гафния, циркония или обрабатывают органическими полимерами. Основное преимущество неорганических носителей — легкость регенерации. Подобно синтетическим полимерам неорганическим носителям можно придать любую форму и получать их с любой степенью пористости.

Итак, к настоящему времени создано огромное число разнообразных носителей для иммобилизации ферментов. Однако для каждого индивидуального фермента, используемого в конкретном технологическом процессе, необходимо подбирать оптимальные варианты как носителя, так и условий и способов иммобилизации.

## 4.6.2. Методы иммобилизации ферментов

Существуют два принципиально различных метода иммобилизации ферментов: без возникновения ковалентных связей между ферментом и носителем (физические методы иммобилизации) и с образованием ковалентной связи между ними (химические методы иммобилизации). Каждый из этих методов осуществляется разными способами (рис. 4.4).

**Физические методы иммобилизации ферментов.** Эти методы реализуются посредством адсорбции фермента на нерастворимом носителе, включением энзимов в поры поперечно-сшитого геля, в полупроницаемые структуры или двухфазные системы.

**Адсорбция ферментов на нерастворимых носителях:** при адсорбционной иммобилизации белковая молекула удерживается на поверхности носителя за счет электростатических, гидро-

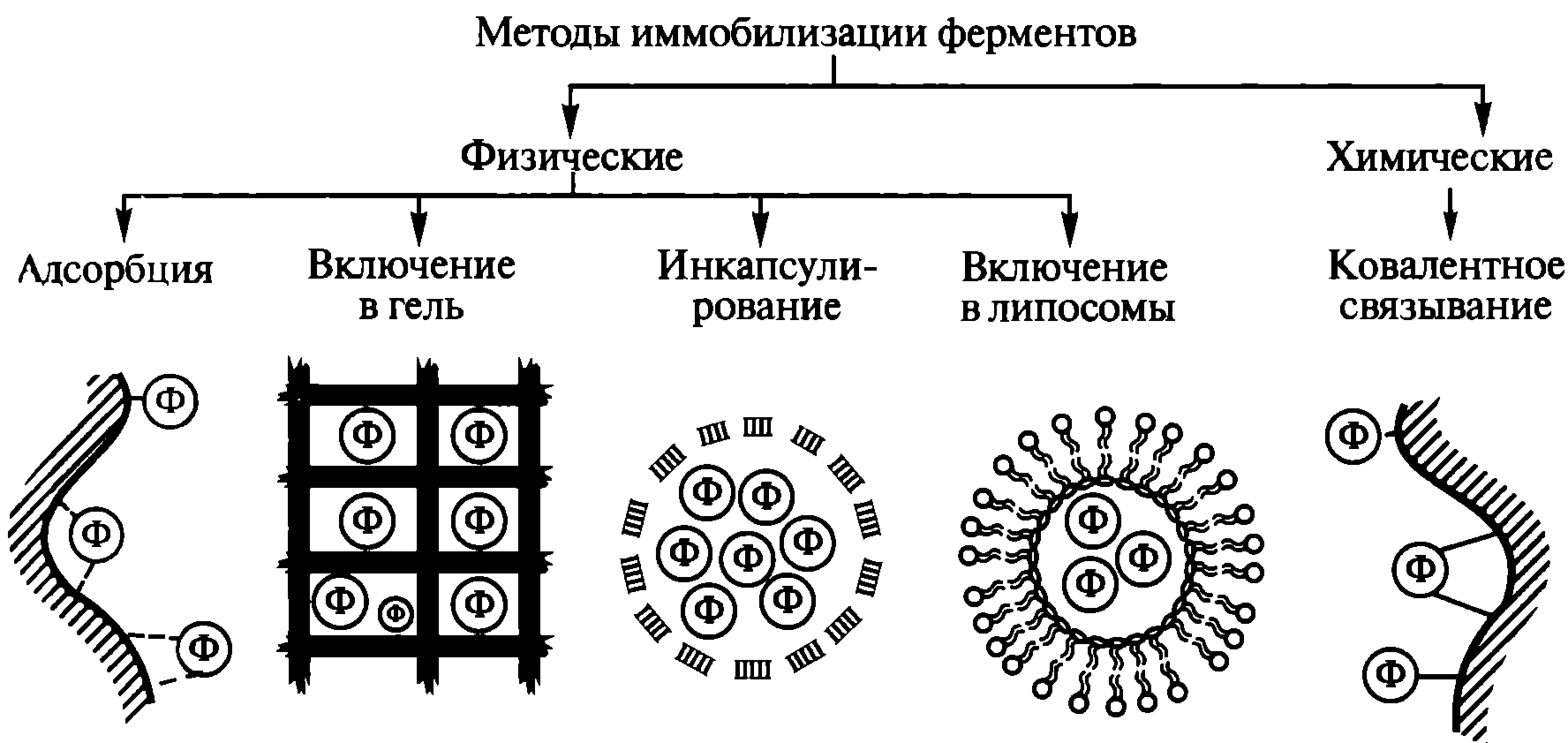


Рис. 4.4. Иммобилизация ферментов (Ф)

фобных, дисперсионных взаимодействий и водородных связей. Адсорбция была первым методом иммобилизации ферментов (Дж. Нельсон, Э. Гриффин, 1916), но и сейчас не потеряла своего значения и стала наиболее широко распространенным способом получения иммобилизованных ферментов в промышленности. В литературе описано получение адсорбционным способом более 70 иммобилизованных ферментов с использованием главным образом таких носителей, как кремнезем, активированный уголь, графитовая сажа, различные глины, пористое стекло, полисахариды, синтетические полимеры, оксиды алюминия, титана и других металлов. Последние применяются наиболее часто. Эффективность адсорбции молекулы белка на носителе определяется удельной поверхностью (плотностью центров сорбции) и пористостью носителя. Процесс адсорбции ферментов на нерастворимых носителях отличается крайней простотой и достигается при контакте водного раствора фермента с носителем (статистическим способом, при перемешивании, динамическим способом с использованием колонок). С этой целью раствор фермента смешивают со свежим осадком, например, гидроксида титана, и высушивают в мягких условиях. Активность фермента при таком варианте иммобилизации сохраняется практически на 100 %, а удельная концентрация белка достигает 64 мг на 1 г носителя.

К недостаткам адсорбционного метода следует отнести невысокую прочность связывания фермента с носителем. При изменении условий иммобилизации могут происходить десорбция фермента, его потеря и загрязнение продуктов реакции. Существенно повысить прочность связывания фермента с носителем может предварительная его модификация (обработка ионами металлов, полифункциональными агентами — полимерами, белками

ми, гидрофобными соединениями, монослоем липида и пр.). Иногда, наоборот, модификации подвергается молекула исходного фермента, однако зачастую это ведет к снижению его активности.

**Иммобилизация ферментов путем включения в трехмерную структуру полимерного геля** — способ иммобилизации, широко распространенный благодаря своей простоте и уникальности. Метод применим для иммобилизации не только индивидуальных ферментов, но и мультиэнзимных комплексов и даже интактных клеток. Иммобилизацию ферментов в геле осуществляют двумя способами. В первом случае фермент вводят в водный раствор мономера, а затем проводят полимеризацию, в результате которой возникает пространственная структура полимерного геля с включенными в его ячейки молекулами фермента. Во втором случае фермент вносят в раствор уже готового полимера, который впоследствии переводят в гелеобразное состояние. Для первого варианта используют гели полиакриламида, поливинилового спирта, поливинилпирролидона, силикагеля, для второго — гели крахмала, агар-агара, каррагинана, агарозы, фосфата кальция.

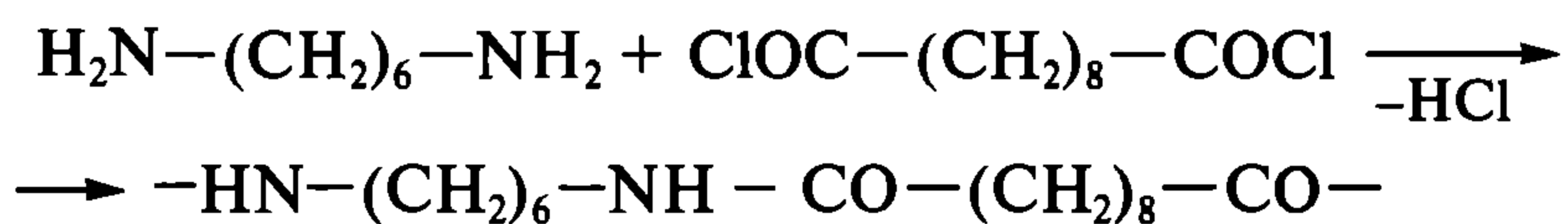
В настоящее время созданы полимеры, получившие название «умные», которые способны изменять свои свойства по принципу обратной связи в ответ на изменение определенных параметров (температура, pH, освещенность) окружающей среды или ее состава. Иммобилизация белков на таком носителе позволяет контролировать выделение биологически активных веществ (лекарственных препаратов, гормонов, регуляторов роста) по мере возникновения потребности в них организма. Так, показана возможность использования гидрогелей на основе полимеров с N-(2-D-глюкоз) акриламидом, сшитых конканавалином А, в качестве систем, работающих по механизму обратной связи и способных выделять предварительно введенный в них инсулин в ответ на повышение концентрации глюкозы в окружающей среде (Н.А. Платэ, И.Л. Валуев и др.).

Иммобилизация ферментов в гелях обеспечивает равномерное распределение энзима в объеме носителя. Большинство гелевых матриц обладает высокой механической, химической, тепловой и биологической стойкостью и обеспечивает возможность многократного использования фермента, включенного в его структуру. Однако метод не пригоден для иммобилизации ферментов, действующих на водонерастворимые субстраты.

**Иммобилизация ферментов в полупроницаемые структуры** — способ иммобилизации, который заключается в отделении водного раствора фермента от водного раствора субстрата с помощью полупроницаемой мембраны, пропускающей низкомоле-

кулярные молекулы субстратов и кофакторов, но задерживающей большие молекулы фермента. Разработано несколько модификаций этого метода, из которых интерес представляет микрокапсулирование и включение ферментов в липосомы.

Первый способ предложен Т. Чангом в 1964 г. и состоит в том, что водный раствор фермента включается внутрь замкнутой микрокапсулы, стенки которой образованы полупроницаемым полимером. Один из механизмов возникновения мембраны на поверхности водных микрокапсул фермента заключается в реакции межфазной поликонденсации двух соединений, одно из которых растворено в водной фазе, а другое — в органической. Примером может служить образование на поверхности раздела фаз микрокапсулы, получаемой путем поликонденсации гексаметилендиамина-1,6 (водная фаза) и галогенангидрида себаценовой кислоты (органическая фаза):



Размер получаемых капсул составляет десятки или сотни микрометров, а толщина мембраны — сотые доли микрометра.

Достоинства метода микрокапсулирования — простота, универсальность, возможность многократного использования нативного фермента (фермент может быть отделен от непрореагировавшего субстрата и продуктов реакции процедурой простого фильтрования). Особенно существенно, что методом микрокапсулирования могут быть иммобилизованы не только индивидуальные ферменты, но и мультиэнзимные комплексы, целые клетки и отдельные фрагменты клеток. К недостаткам метода следует отнести невозможность инкапсулированных ферментов осуществлять превращения высокомолекулярных субстратов.

Близким к инкапсулированию методом иммобилизации можно считать включение водных растворов ферментов в липосомы, представляющие собой сферические или ламеллярные системы двойных липидных бислоев. Впервые данный способ был применен для иммобилизации ферментов Дж. Вайсманом и Дж. Сессом в 1970 г. Для получения липосом из растворов липида (чаще всего лецитина) упаривают органический растворитель. Оставшуюся тонкую пленку липидов диспергируют в водном растворе, содержащем фермент. В процессе диспергирования происходит самосборка бислойных липидных структур липосомы, содержащих включенный раствор фермента.

Ферменты, иммобилизованные путем включения в структуру липосом, используют преимущественно в медицинских и научных целях, ибо значительная часть ферментов в клетке локализована

в составе липидного матрикса биологических мембран, поэтому изучение липосом имеет большое значение для понимания закономерностей процессов жизнедеятельности в клетке.

Другие приемы иммобилизации ферментов, основанные на физических методах, менее распространены по сравнению с рассмотренными выше.

**Химические методы иммобилизации ферментов.** Иммобилизация ферментов путем образования новых ковалентных связей между ферментом и носителем — наиболее массовый способ получения промышленных биокатализаторов.

В отличие от физических методов этот способ иммобилизации обеспечивает прочную и необратимую связь фермента с носителем и часто сопровождается стабилизацией молекулы энзима. Однако расположение фермента относительно носителя на расстоянии одной ковалентной связи создает стерические трудности в осуществлении каталитического процесса. Фермент отделяют от носителя с помощью вставки (сшивки, спейсера), в роли которой чаще всего выступают бифункциональные и полифункциональные агенты (бромциан, гидразин, сульфурилхлорид, глутаровый диальдегид и др.). Например, для выведения галактозилтрансферазы из микроокружения носителя между ним и ферментом вставляют последовательность  $-\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{CH}_2)_5-\text{CO}-$ . В этом случае структура иммобилизованного фермента включает носитель, вставку и фермент, соединенные между собой ковалентными связями (рис. 4.5).

Принципиально важно, чтобы в иммобилизации фермента участвовали функциональные группы, не существенные для его каталитической функции. Так, гликопротеины обычно присоединяют к носителю через углеводную, а не через белковую часть молекулы фермента.

Число методических приемов, разработанных для осуществления ковалентной иммобилизации ферментов, исключительно велико. Все методы химической иммобилизации классифицируют в зависимости от природы реакционной группы носителя, вступающей во взаимодействие с молекулой фермента. Ниже пред-

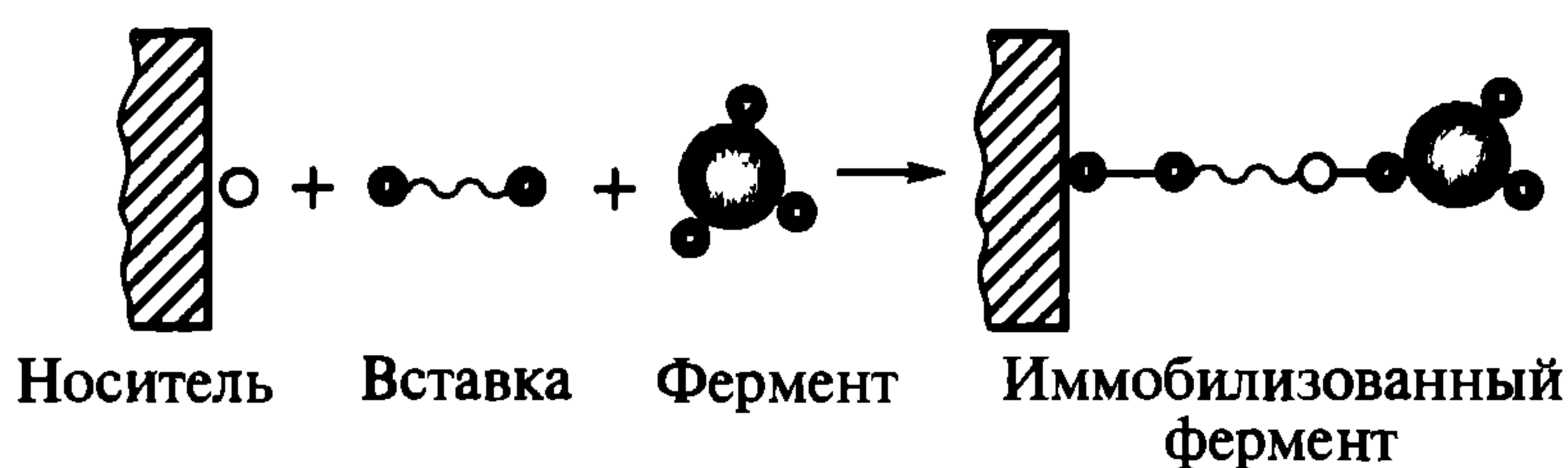
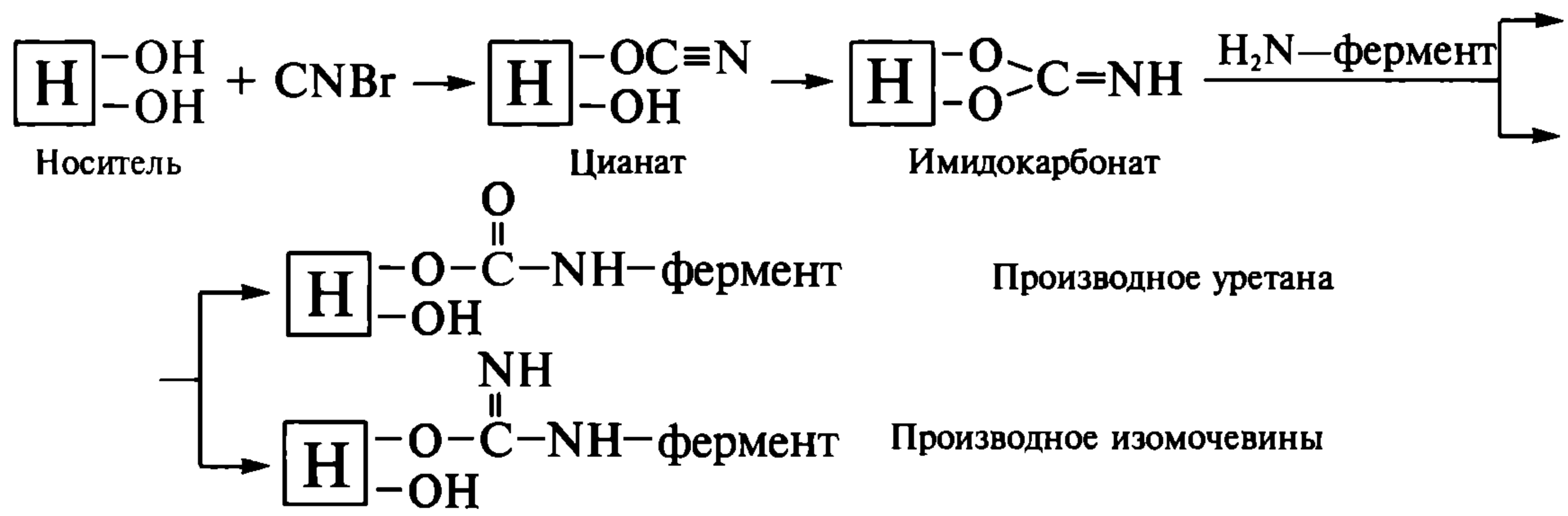


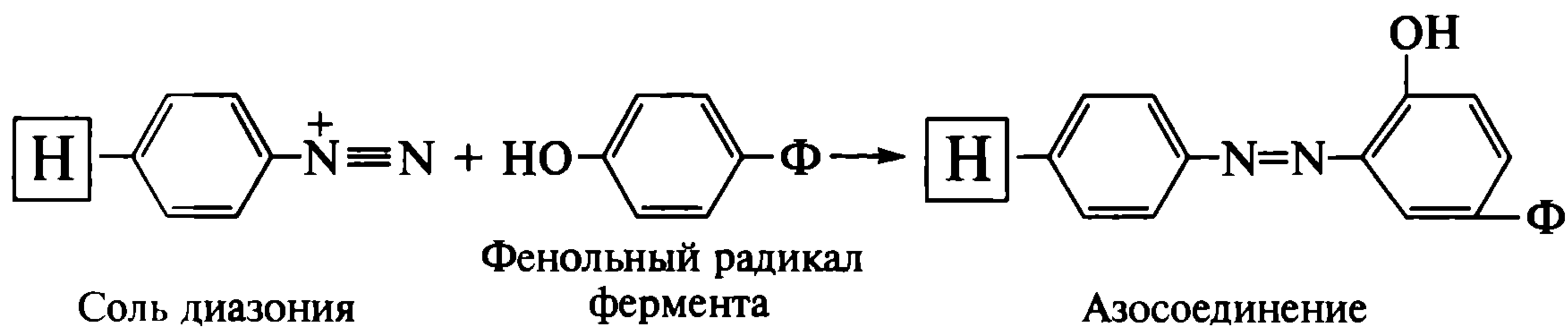
Рис. 4.5. Схема иммобилизации фермента химическим методом (по Н. В. Березину с сотр., 1987)

ставлен ряд примеров, иллюстрирующих некоторые способы химической иммобилизации ферментов.

**Иммобилизация ферментов на носителях, обладающих гидроксогруппами**, — наиболее распространенный метод образования ковалентной связи между ферментом и полисахаридным носителем или синтетическим диольным соединением. Бромциановый метод был предложен Р. Аксеном, Дж. Поратом и С. Эрнбаком в 1967 г. При обработке носителя бромцианом возникают реакционноспособные цианаты и имидокарбонаты, которые при взаимодействии с нуклеофильными аминогруппами фермента образуют производные изомочевины и уретанов:



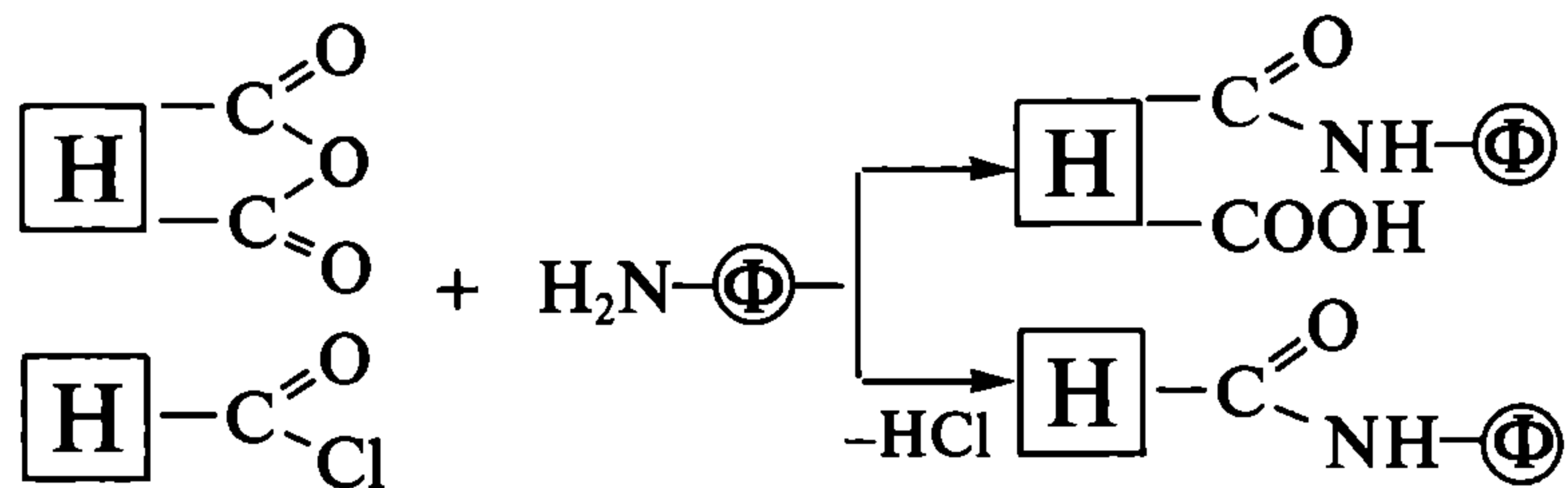
**Иммобилизация ферментов на носителях, обладающих аминогруппами**: первичные аминогруппы носителя, связанные с ароматическим кольцом, предварительно превращают в соли диазония, которые затем подвергают разнообразным реакциям сочетания. В реакции сочетания вступают фенольные, имидазольные, аминные, гуанидиновые, тиольные группы белков. Так, в щелочной среде фенольные радикалы тирозина образуют прочные азосоединения, в составе которых белок связан с носителями:



Существенно, что *n*-аминофенильные функции могут быть легко введены в разнообразные носители.

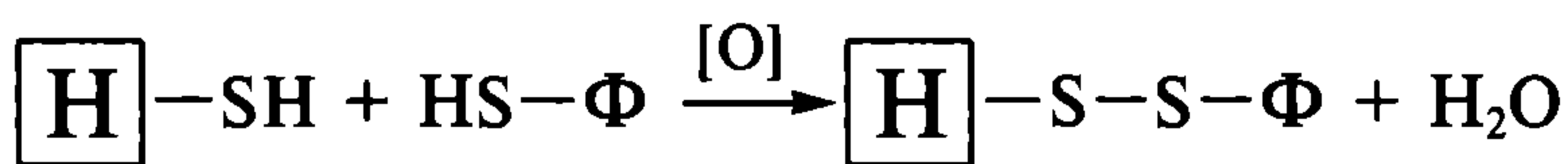
**Иммобилизация на носителях, обладающих активированными производными карбоксильной группы**: наиболее часто для соединения аминогрупп белка с ацильными группировками носителя используют ангидриды, галогенангидриды, активированные эфиры и другие производные карбоновых кислот. Например,





Реакционная способность производных карбоновых кислот в реакциях ацилирования аминогрупп фермента уменьшается от галогенангидридов до эфиров.

**Иммобилизация на носителях, обладающих сульфгидрильными группами:** сульфгидрильные группы носителя и фермента легко окисляются с образованием дисульфидных связей под действием кислорода воздуха:



Иммобилизация путем химического присоединения биокатализатора к носителю отличается высокой эффективностью и прочностью связи. Несмотря на это, методы ковалентной иммобилизации ферментов все еще малодоступны для промышленного использования в связи со сложностью и дороговизной их применения. Однако они остаются незаменимыми инструментами в практике проведения научных и лабораторных исследований по созданию энзимов с контролируемыми свойствами.

### 4.6.3. Иммобилизация клеток

Методы иммобилизации универсальны для всех видов иммобилизованных биокатализаторов — индивидуальных ферментов, клеток, субклеточных структур, комбинированных препаратов.

Наряду с иммобилизацией ферментов в последнее время все большее внимание уделяется иммобилизации клеток и субклеточных структур. Это объясняется тем, что при использовании иммобилизованных клеток отпадает необходимость выделения и очистки ферментных препаратов, применение кофакторов; создается возможность получения полиферментных систем, осуществляющих многостадийные непрерывно действующие процессы.

В промышленных процессах чаще используют покоящиеся клетки. Действительно, многие хозяйственно ценные продукты синтезируются главным образом в стационарной фазе развития клеточных культур. Растущие клетки нарушают структуру носителя. Образующиеся при делении дочерние клетки, покидая но-

сигель, загрязняют целевой продукт. Для подавления роста иммобилизованных клеток растений используют дефицит фитогормонов, а рост клетки бактерий тормозят добавлением антибиотиков.

Иммобилизованные клетки микроорганизмов применяют для биотрансформации органических соединений, разделения рацемических смесей, гидролиза ряда сложных эфиров, инверсии сахарозы, восстановления и гидроксилирования стероидов. Иммобилизованные хроматофоры используют в лабораторных установках для синтеза АТФ, а пурпурные мембраны — для создания искусственных фотоэлектрических преобразователей — аналогов солнечных батарей. Разрабатывается реактор на основе иммобилизованных клеток дрожжей для получения этанола из мелассы, в котором дрожжи сохраняли бы способность к спиртовому брожению в течение 1 800 ч. Из более чем 2 000 известных в настоящее время ферментов иммобилизована и используется для целей инженерной энзимологии примерно десятая часть (преимущественно оксидоредуктазы, гидролазы и трансферазы).

Для осуществления химических процессов с помощью иммобилизованных ферментов применяют колоночные, трубчатые, пластинчатые и танкерные реакторы разного объема и производительности. Иммобилизованные ферментные системы функционируют в биореакторе в виде неподвижной фазы, через которую протекает среда с субстратом, подлежащим химическому превращению (гетерогенный катализ). В таких реакторах наряду с непрерывным режимом используется и периодический. Для эффективного перемешивания и газообмена биореактор снабжают мешалкой. Повреждающее действие мешалки на биокатализатор устраняют, закрепляя определенным образом его гранулы. Например, в биореакторе «корзиночного» типа мешалка вращается в пустом цилиндре из сетчатой структуры (корзина), в ячейках которой закреплен иммобилизованный фермент. Во внутреннем объеме трубчатых реакторов рыхло расположены полые волокна, заполненные биокатализатором. Степень превращения субстрата в продукт (например, фумарата аммония в аспартат) в таких реакторах достигает 90 %.

#### **4.6.4. Промышленные процессы с использованием иммобилизованных ферментов и клеток**

Сочетание уникальных каталитических свойств энзимов с преимуществами иммобилизованных ферментов как гетерогенных катализаторов позволило создать новые промышленные техноло-

гические процессы. Следует отметить, что все они относятся к производству пищевых продуктов и лекарственных препаратов.

В настоящее время в мире разработаны следующие крупномасштабные производства с использованием иммобилизованных ферментов и клеток:

1. Получение глюкозофруктозных сиропов.
2. Получение оптически активных L-аминокислот из их рацемических смесей.
3. Синтез L-аспарагиновой кислоты из fumarата аммония.
4. Синтез L-аланина из L-аспарагиновой кислоты.
5. Синтез L-яблочной кислоты из fumarовой кислоты.
6. Получение безлактозного молока.
7. Получение сахаров из молочной сыворотки.
8. Получение 6-аминопенициллановой кислоты.

В качестве примера рассмотрим некоторые из них.

**Получение глюкозофруктозных сиропов.** Фруктоза (фруктовый, плодовый или медовый сахар) — важнейший в физиологическом и технологическом отношении природный моносахарид. Превращаясь в печени и кишечнике млекопитающих в глюкозу, фруктоза включается в пластический и энергетический обмен клетки. Она в 2,5 раза слаще глюкозы и в 1,7 раза слаще тростникового сахара (сахароза), благодаря чему фруктоза — менее калорийный пищевой продукт по сравнению с последними. В отличие от глюкозы обмен фруктозы не контролируется инсулином, поэтому фруктовый сахар может потребляться больными диабетом. Фруктоза практически не вызывает кариеса зубов. В смеси с глюкозой фруктоза не кристаллизуется, поэтому широко используется для производства кондитерских изделий.

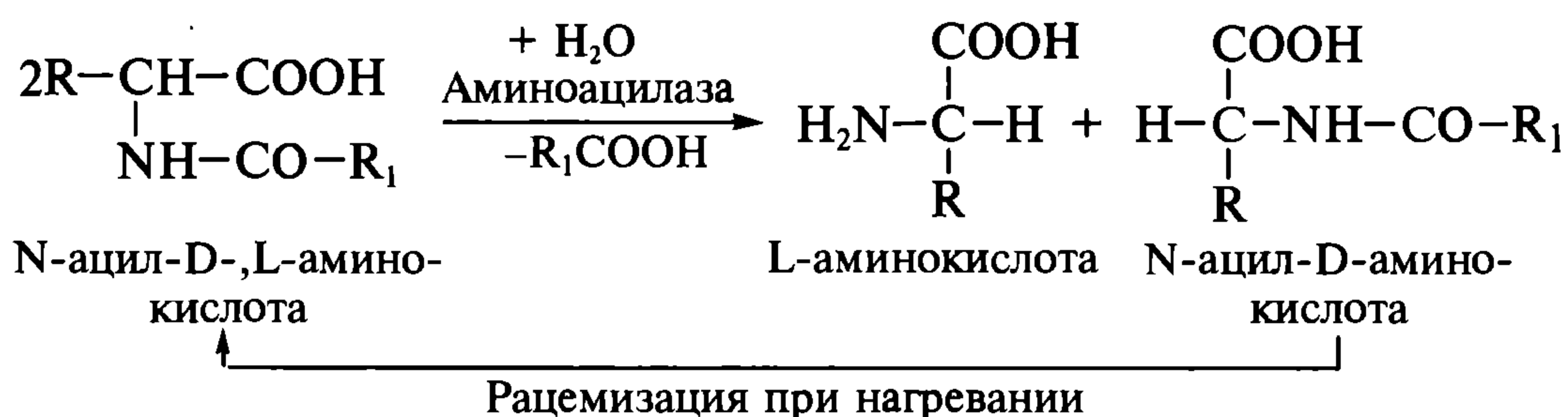
Объем производства сахарозы за последние 100 лет возрос в 15 раз и составляет, по разным оценкам, 30 — 40 кг в год на человека. Однако, несмотря на явные преимущества использования фруктозы, первая промышленная установка для превращения глюкозы во фруктозу с помощью иммобилизованной глюкоизомеразы была запущена лишь в 1973 г. (компания «Клинтон Корн», США). Исходным сырьем для этого процесса служит глюкоза, которую получают при гидролизе кукурузного или картофельного крахмала в присутствии минеральных кислот. Для конструирования промышленного биокатализатора глюкоизомеразу сорбируют на пористых неорганических носителях или ионообменных смолах. Во многих случаях используют иммобилизованные клетки разного происхождения (*Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Streptomyces phaeochromogenes*, *S. olivaceus*, *S. venezuelae*). Коммерческие препараты иммобилизованной глюкоизомеразы имеют вид гранул, шариков, волокон или аморфной

массы. Наиболее эффективными биореакторами для получения фруктозы признаны аппараты колонного типа высотой около 5 м, в которых по сравнению с реакторами перемешивания расход фермента минимален.

Производительность такого реактора варьирует от 600 до 9 000 кг глюкозофруктозного сиропа на 1 кг иммобилизованного фермента в зависимости от чистоты исходного сырья, а время полуинактивации катализатора — 20 — 50 суток. Возникающий в результате каталитического процесса глюкозофруктозный сироп содержит 42 — 45 % фруктозы, около 51 % глюкозы, небольшое количество олигосахаридов и по сладости соответствует инвертному сахару, получаемому при гидролизе сахарозы. Эти смеси постепенно вытесняют инвертный сахар в промышленности и медицине. Глюкозофруктозную смесь широко применяют для производства тонизирующих напитков, консервированных фруктов, кондитерских изделий, хлеба, мороженого и пр. Экономические расчеты показали, что производство глюкозофруктозных сиропов с использованием иммобилизованной глюкоизомеразы в 1,5 раза выгоднее получения сахарозы из сахарной свеклы по традиционной технологии. Благодаря этому обстоятельству производство глюкозофруктозных сиропов в мире постоянно растет. Так, в 1980 г. 10 % потребляемого населением Японии сахара заменено на глюкозофруктозную смесь. В США эта доля к началу нового столетия достигла 40 %.

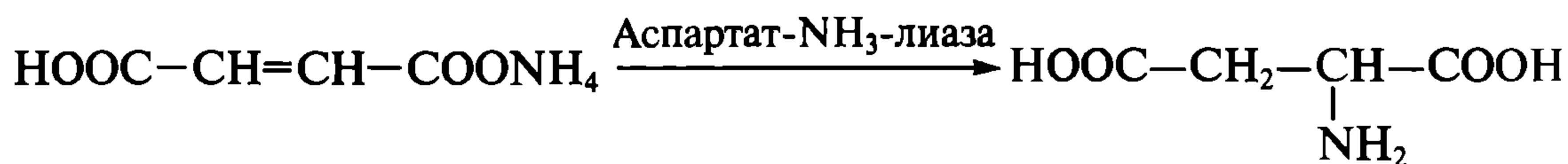
**Получение L-аминокислот из их рацемических смесей.** Наряду с микробиологическими способами важное значение имеют химические методы промышленного получения природных аминокислот, в том числе незаменимых. Однако в результате химических реакций, используемых для синтеза аминокислот, содержащих асимметрические атомы углерода, с одинаковой скоростью образуются как D-, так и L-стереоизомеры, т. е. всегда возникает рацемическая смесь. Между тем в живых клетках обмену подвергаются лишь L-аминокислоты. Разделение рацемических смесей на составляющие их оптические изомеры (представляющее труднейшую задачу) явилось первым промышленным процессом с использованием иммобилизованных ферментов. Этот процесс был осуществлен в Японии в 1969 г. (компания «Танабе Сейяку») с помощью аминоксилазы, иммобилизованной на ДЕАЕ-целлюлозе. В качестве исходных соединений в данном превращении используют N-ацилированные производные D-, L-аминокислот, получаемые с помощью химического синтеза. Вследствие своей стереоспецифичности аминоксилаза гидролизует лишь N-ацил-L-стереоизомер, отщепляя от него ацильный радикал, в результате чего растворимость образующейся L-аминокислоты резко возрастает и ее легко можно отделить от своего антипода физико-химическими методами. При на-

гревании оставшаяся N-ацил-D-аминокислота рацемизируется, т.е. превращается в исходную смесь, которая вновь подвергается воздействию фермента:



Аминоацилаза строго специфична к структуре только ацильной части субстрата, поэтому одна и та же установка с иммобилизованным ферментом используется для получения различных аминокислот, в том числе L-валина, L-метионина, L-фенилаланина и L-триптофана. Время полуинаktivации иммобилизованного энзима составляет 65 суток; на японских предприятиях он используется без замены более 8 лет и обеспечивает снижение стоимости производства аминокислот на 40 % по сравнению с технологией, где применяются свободные молекулы фермента.

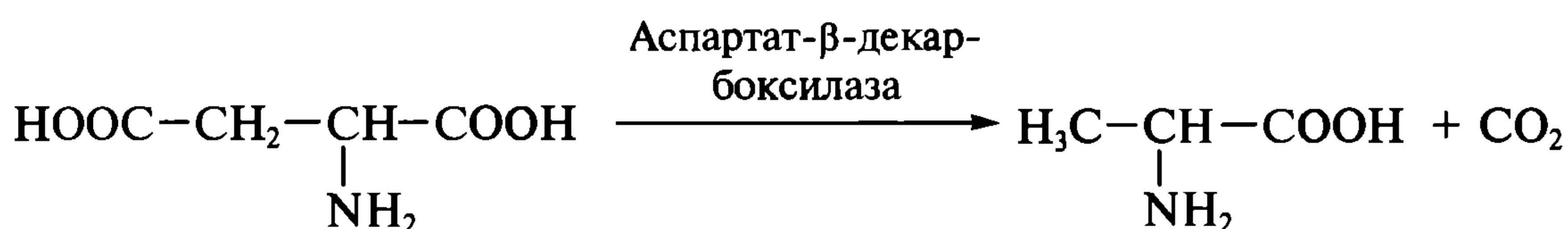
**Получение L-аспарагиновой кислоты.** Аспарагиновая кислота широко употребляется в качестве пищевой добавки (подсластитель и подкислитель). Первая в мире промышленная установка для синтеза L-аспарагиновой кислоты из получаемого химическим путем фумарата аммония была запущена в 1973 г. в Японии (фирма «Танабе Сейяку»); в ней использованы иммобилизованные в полиакриламидном геле клетки кишечной палочки *E. coli*, содержащие аспартат-аммиак-лиазу:



Полиакриламидный гель с иммобилизованными микробными клетками формируют в виде кубиков размером 2—3 мм, которыми заполняют колонку объемом 1 м<sup>3</sup>. Через колонку пропускают раствор фумарата аммония. При подкислении выходящего из колонки элюата до pH 2,8 и охлаждении до 15 °С из него выкристаллизовывается аспарагиновая кислота в виде препарата 100 %-й чистоты. Процесс получения аспартата полностью автоматизирован и осуществляется в непрерывном режиме. Производительность процесса — 1 700 кг чистой аспарагиновой кис-

лоты в сутки на реактор. Имобилизованные клетки кишечной палочки сохраняют активность фермента на 80 % в течение 120 дней и на 50 % в течение 600 дней работы реактора, в то время как свободные клетки — всего на протяжении 10 дней с уровнем активности 25 % от исходной. В Армении был налажен промышленный процесс получения аспартата особой степени чистоты с использованием имобилизованной аспартат-аммиак-лиазы на базе научных разработок химфака МГУ им. М. В. Ломоносова (1974).

**Получение L-аланина.** В настоящее время основной промышленный способ получения L-аланина — ферментативное декарбоксилирование L-аспарагиновой кислоты:



Процесс превращения L-аспартата в L-аланин катализируется аспартат-β-декарбоксилазой ряда микроорганизмов (*Pseudomonas dacinhae*, *Alcaligenes faecalis*, *Achromobacter pestifier*), имобилизованных в полиакриламидном геле, каррагинане или полиуретане. Установка, разработанная японской фирмой «Танабе Сейяку», производит этим способом 10 т аланина в месяц. Усовершенствование процесса связано с использованием в качестве сырья фумарата аммония. В данном случае процесс получения L-аланина становится двустадийным и реализуется в двух последовательно расположенных реакционных колонках. На первом этапе фумарат аммония превращается в L-аспарагиновую кислоту, которая без выделения из реакционной среды на втором этапе претерпевает β-декарбоксилирование с образованием аланина.

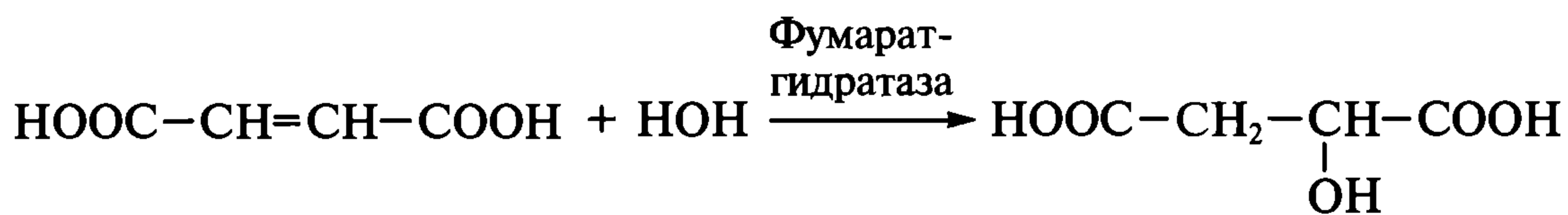
С помощью имобилизованных клеток *Serratia marcescens* из треонина и глюкозы синтезируют L-изолейцин, а с помощью имобилизованных клеток *Corynebacterium glutamicum* — L-глутаминовую кислоту из L-глюкозы, L-триптофан из индола, L-орнитин из L-аргинина.

Таким образом, расширение производства аминокислот стало возможным благодаря изменению технологии получения промышленных биокатализаторов и снижению затрат при их производстве.

**Получение L-яблочной кислоты.** Яблочная кислота — заменитель лимонной в продуктах питания и лекарственных препаратах.

Яблочную кислоту получают, используя имобилизованные в полиакриламидном геле клетки, содержащие фумаратгидратазу.

В присутствии этого фермента происходит присоединение воды по двойной связи в молекуле фумаровой кислоты:



В интактных клетках время полуинактивации фумаратгидратазы составляет 6 суток, в иммобилизованных в полиакриламидном геле — 55 суток, а в иммобилизованных в геле на основе каррагинана — 160 суток.

**Получение 6-аминопенициллановой кислоты.** 6-Аминопенициллановая кислота (6-АПК) — ценное исходное соединение для получения эффективных полусинтетических аналогов природных пенициллинов. Получение 6-АПК в промышленности путем химического гидролиза бензилпенициллина сопряжено с большими трудностями в связи с крайней неустойчивостью лактамного цикла его молекулы. Так, при щелочном гидролизе бензилпенициллина выход 6-АПК составляет всего 1 %. Продуктивность этого процесса удалось значительно повысить благодаря применению для гидролиза иммобилизованных бактериальных клеток, содержащих пенициллинамидазу.

Со второй половины 70-х годов XX в. вся 6-АПК, выпускаемая в России, и значительная часть 6-АПК, получаемая в Италии, производятся с помощью иммобилизованных ферментов. На итальянских фирмах применяют фермент, иммобилизованный путем включения клеток *E. coli* в волокна триацетата целлюлозы, а на российских предприятиях используют бактериальные клетки, иммобилизованные в полиакриламидном геле. Переход к технологии, применяющей иммобилизованные бактериальные клетки, обеспечивает высокий выход 6-АПК, составляющий 80 — 85 %. По данным японских исследователей, время полуинактивации пенициллинамидазы, содержащейся в иммобилизованных в полиакриламидном геле бактериальных клетках, равно 42 суткам при 30 °С или 17 суткам при 40 °С.

Внедрение в промышленность биокаталитической технологии производства 6-АПК привело к существенному увеличению выпуска полусинтетических пенициллинов и снижению их себестоимости.

Изложенное далеко не исчерпывает перечень химических производств, базирующихся на использовании иммобилизованных ферментов и клеток. Список ряда биотехнологических процессов с применением иммобилизованных биокатализаторов, разработанных на уровне промышленных и опытных установок, представлен в табл. 4.3.



## Применение иммобилизованных ферментов

Название и шифр фермента	Источник фермента. Способ иммобилизации	Биотехнологический процесс
Ацилнейтраминат-9-фосфат-синтаза (КФ 4.1.3.20)	Фермент <i>E. coli</i> . Включение в полиакриламидный гель	Синтез сиаловых кислот
$\beta$ -Галактозидаза (КФ 3.2.1.23)	Фермент <i>Kluyveromyces fragilis</i> , <i>K. lactis</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>A. oryzae</i> . Включение в нити ацетата целлюлозы, полиакриламидный гель; адсорбция на фенолформальдегидной смоле, модифицированных керамике и кремнеземе	Гидролиз лактозы; получение безлактозного молока, глюкозы и галактозы
Глюкоамилаза (КФ 3.2.1.33)	Фермент <i>Aspergillus niger</i> . Хелатирование целлюлозой, стеклом, нейлоном; ковалентное связывание с клетками <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i>	Превращение олигосахаридов в глюкозу
3-Кетостероид- $\Delta'$ дегидрогеназа	Клетки <i>Mycobacterium globiformis</i> . Включение в полиакриламидный гель	Трансформация гидрокортизона в преднизолон
Пероксидаза (КФ 1.11.1.7)	Фермент из хрена, сополимеризованный с тирозином и включенный в гель альгината	Окисление фенола в сточных водах
Протеазы (КФ 3.4)	Ферменты <i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. thermoproteolyticus</i> , <i>Mucor pusillus</i> . Включение в полиакриламидный гель, силикагель; хелатирование на поверхности стекла, микроорганизмов	Получение белковых гидролизатов
Пуллуназа (КФ 3.2.1.9)	Клетки <i>Aureobacidium pullulan</i> , <i>Arthrobacter</i> . Ковалентное связывание с биогелем	Расщепление $\alpha$ -1,6-гликозидных связей в амилопектине. Получение декстринов

Название и шифр фермента	Источник фермента. Способ иммобилизации	Биотехнологический процесс
Термолизин (КФ 3.4.24.4)	Клетки <i>Bacillus thermoproteolyticus</i> , включенные в полиуретан	Реакция конденса- ции L-аспарагино- вой кислоты и ме- тилового эфира L-фенилаланина с образованием пептидного заме- нителя сахарозы аспартама (в 100 раз слаще сахарозы)
Тирозинфенол- лиаза (КФ 4.1.99.2)	Клетки <i>Erwinia herbicola</i> , <i>E. intermedia</i> . Включение в полиакриламидный гель	Синтез тирозина из ПВК, NH <sub>3</sub> и фенола; L-серина и фенола. Синтез ДОФА из ПВК, NH <sub>3</sub> и пирокате- хина
Триптофаназа (КФ 4.1.99.1)	Клетки <i>E. coli</i> . Включение в нити триацетата целлюлозы и гель каррагинана	Получение трипто- фана из L-серина и индола

#### 4.6.5. Ферментативная конверсия целлюлозы в глюкозу

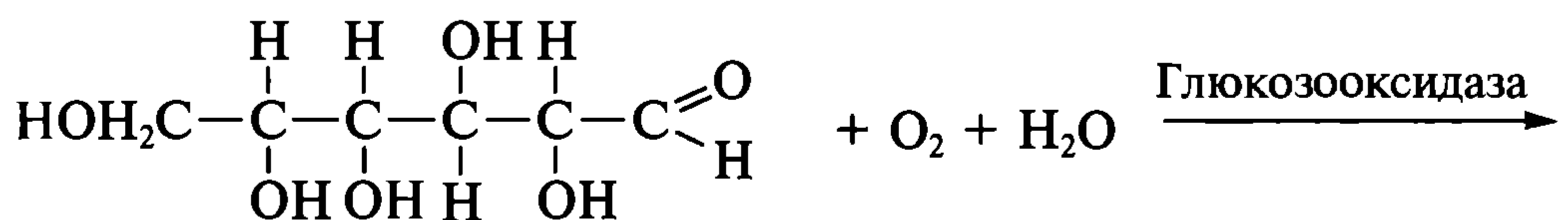
В связи со значительным истощением углеводородного сырья насущной проблемой для дальнейшего развития биотехнологии становится освоение новых сырьевых источников. По существу, неисчерпаемый и одновременно возобновляемый источник сырья представляет собой растительная биомасса (многолетние растения, вторичные продукты и отходы их промышленной и сельскохозяйственной переработки), основным компонентом которой служит целлюлоза (клетчатка). Ежегодно на Земле создается около 100 млрд т целлюлозы.

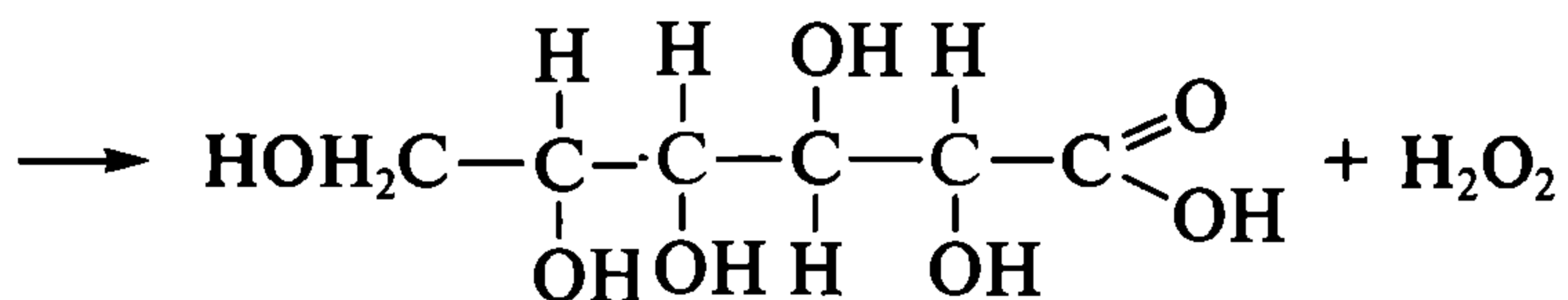
Благодаря плотной упаковке линейно построенных полигликозидных цепей целлюлоза устойчива к действию большинства растворителей и химических агентов, в том числе сильных кислот. В природе существуют так называемые целлюлолитические организмы (бактерии, плесневые грибы) и некоторые виды насе-

комых, содержащие полиферментные комплексы целлюлаз, обеспечивающие гидролиз клетчатки до глюкозы. Целлюлазный комплекс ферментов включает эндо-1,4-β-глюканазу, экзоцеллобиогидролазы, целлобиазы и экзо-1,4-β-глюкогидролазу, механизм действия которых на клетчатку оказался одинаковым для всех исследованных целлюлазных комплексов независимо от их происхождения. Попадая на целлюлозосодержащие материалы, микроорганизмы выделяют целлюлазы, которые, сорбируясь (иммобилизуясь) на субстрате, постепенно расщепляют его до глюкозы. В последние годы разработаны технологические схемы для непрерывного ферментативного гидролиза целлюлозы на уровне опытных установок. Процесс протекает в противоточных реакторах колонного типа, плотно заполненных целлюлозой. Расчеты показывают, что перевод процесса на промышленный уровень обеспечивает получение 24 т глюкозы в сутки. Дальнейшее совершенствование эффективности метода конверсии целлюлозосодержащего сырья в глюкозу и далее в этанол и углеводороды позволит создать альтернативные пути получения ценных моносахаридов и жидкого топлива из возобновляемого сырья, а также решить еще одну важную проблему — утилизацию экологически опасных отходов производства.

#### 4.6.6. Биосенсоры на основе иммобилизованных ферментов

Высокая эффективность биологических катализаторов и специфичность их действия делают ферменты идеальными реагентами для аналитической химии. Благодаря этим особенностям с помощью ферментов обнаруживаются вещества при предельно низкой концентрации в присутствии множества других соединений. К настоящему времени созданы искусственные аналитические системы различных конструкций (биосенсоры, датчики, ферментные электроды, проточные анализаторы), содержащие иммобилизованные ферменты и клетки и предназначенные для автоматического детектирования продуктов энзиматического превращения. Например, если использовать иммобилизованную глюкозооксидазу, то концентрацию окисляемой кислородом глюкозы определяют, регистрируя количество выделившегося в ходе реакции пероксида водорода:





В зависимости от концентрации анализируемых веществ выбирают тот или иной способ их детекции. Так, количественное содержание пероксида водорода (ммоль/л) можно определить одним из следующих методов:

Полярографический (накопление $\text{H}_2\text{O}_2$ ) .....	0,1
Колориметрический ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}$ -дианизидин $\xrightarrow{\text{пероксидаза}}$ окрашенный продукт) .....	$0,1 \cdot 10^{-3}$
Люминесцентный ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{люминол} \longrightarrow \longrightarrow$ хемилюминесцентный продукт, $\lambda_{\text{макс}} = 425 \text{ нм}$ ) .....	$0,1 \cdot 10^{-6}$

Исследователями ведутся работы по созданию биосенсоров на основе цитохромов  $\text{P}_{450}$ , метаболизирующих более 200 000 различных соединений, среди которых лекарства, пестициды, биологически активные вещества. Начаты разработки новых поколений биодатчиков на базе аффинных взаимодействий (биосродства) типа фермент — ингибитор, антитело — антиген, агонист (антагонист) — клеточный рецептор, а также на основе полупроводниковых структур и мезоэлектрического эффекта. Последние два биодатчика дают возможность создавать сенсоры, чувствительные к газам, что имеет существенное значение для создания роботов, реагирующих на изменения внешних воздействий.

Технологические варианты реакторов с иммобилизованными ферментами весьма разнообразны — колонки, трубки, полые волокна и пр. С их помощью на практике определяют концентрацию широкого спектра соединений — глюкозы, аминокислот, мочевины, пенициллина, АТФ, НАДН, ФМН, стероидов, триглицеридов, желчных кислот и многих других (J. Aylott, R. Kopelman, 2000). Так, американскими исследователями сконструирован микродатчик на основе глюкозооксидазы и рутениевого красителя, иммобилизованных в полиакриламидной матрице с использованием субмикронных оптических волокон. Микробиосенсор, не вызывая повреждений, может быть введен в клетку и даже в отдельные ее компартменты для измерения содержания в них глюкозы и кислорода. Предложены датчики на базе иммунодетекции для проведения экспресс-анализов на присутствие производных диоксина (Nomura et. al., 2000) и оценки содержания биогенных аминов (с помощью моноаминооксидазы) в пищевых продуктах в связи с процессами их старения. Для определения мочевины ферментным электродом требуется всего 30 с.

Биосенсоры на основе иммобилизованных ферментов помогают выполнять десятки быстрых и точных анализов при диагнос-

тике заболеваний, контролировать содержание вредных веществ (инсектицидов, пестицидов, удобрений) в пищевых продуктах и в воздухе. Биосенсоры нашли применение в решении аналитических задач в химической и микробиологической промышленности, а также в научных исследованиях.

#### **4.6.7. Иммобилизованные ферменты в медицине**

Иммобилизованные ферменты имеют огромное значение для медицины. В частности, большой рынок сбыта занимают тромболитические ферменты, предназначенные для борьбы с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Так, в отечественную клиническую практику внедрен препарат «стрептодеказа», содержащий стрептокиназу — активатор предшественника протеиназы плазмина, предотвращающий образование тромба в кровеносной системе. Ферменты, разрушающие некоторые незаменимые аминокислоты (например, аспарагиназа), используют для борьбы со злокачественным ростом опухолей. Протеолитические ферменты (трипсин, химотрипсин, субтилизин, коллагеназа), иммобилизованные на волокнистых материалах (целлюлоза, полиамидные волокна, декстран и др.), применяют для эффективного лечения ран, язв, ожогов, абсцессов, а их белковые ингибиторы — в заместительной терапии для лечения эмфиземы и панкреатитов.

Исключительно важны с практической точки зрения работы, посвященные направленному транспорту лекарственных веществ. В этом отношении особенно выгодны инкапсулированные ферменты типа искусственной клетки. Так, микрокапсулы, стенки которых представлены оболочкой эритроцита («тень эритроцита»), а их содержимое заполнено ферментом аспарагиназой, переносятся кровотоком к зонам скопления аспарагина и поэтому применяются для лечения аспарагинзависимых опухолей, в частности саркомы. Колонки, заполненные микрокапсулами с ферментом, используют для диализа в аппарате «искусственная почка», которая работает в 100 раз эффективнее обычного аппарата.

Таким образом, использование иммобилизованных ферментов во многих жизненно важных отраслях народного хозяйства становится все более массовым. Выгодное сочетание избирательности и эффективности с долговечностью и стабильностью иммобилизованных ферментов в корне меняет химическое производство, способы добывания сырья, способствует созданию новых биотехнологических процессов и методов терапии, совершенствует медицинскую диагностику, анализ, органический синтез и оказывает огромное влияние на качество жизни человека.

## ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Генетическая инженерия — ветвь молекулярной генетики, исследующая возможности и способы создания лабораторным путем (*in vitro*) генетических структур и наследственно измененных организмов, т. е. создания искусственных генетических программ, с помощью которых направленно конструируются молекулярные генетические системы вне организма с последующим их введением в живой организм. Обычно употребляют два названия данного научного направления — *генетическая инженерия* и *генная инженерия*, являющиеся как бы синонимами. Однако их смысловое содержание неодинаково: генетическую инженерию связывают с генетикой, а генная имеет отношение только к генам. Кроме того, генетическая инженерия точнее раскрывает содержание дисциплины — создание генетических программ, основная задача которых — создание *in vitro* молекул ДНК посредством соединения фрагментов ДНК, которые в естественных условиях чаще не сочетаются благодаря межвидовым барьерам (рекомбинантные ДНК). Молекула *рекомбинантной ДНК* представляет собой соединенные в бесклеточной системе два компонента: вектор, обеспечивающий механизм репликации и экспрессии, и фрагмент *клонированной* (чужеродной) *ДНК*, содержащий интересующие исследователя генетические элементы.

Согласно определению национальных институтов здоровья США, рекомбинантными ДНК называют молекулы ДНК, полученные вне живой клетки путем соединения природных или синтетических фрагментов ДНК с молекулами, способными реплицироваться в клетке.

### 5.1. ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Генетическая инженерия возникла на стыке многих биологических дисциплин: молекулярной генетики, энзимологии, биохимии нуклеиновых кислот и др. Первая рекомбинантная ДНК получена в 1972 г. (П. Бергом с сотр.) и была составлена из фрагмента ДНК обезьяньего вируса ОВ40 и бактериофага  $\lambda$  *dvgal* с галактозным

**Основные этапы развития генетической инженерии**

Год	Автор	Содержание открытия
1869	Ф. Мишер	Выделена ДНК из ядер клеток гноя
1953	Д. Уотсон, Ф. Крик	Сконструирована модель двойной спирали ДНК на основании результатов рентгеноструктурного анализа ДНК
1961	А. Мармур и П. Доти	Открыто явление ренатурации ДНК и установлены точность и специфичность реакции гибридизации нуклеиновых кислот
1962	В. Арбер	Впервые получены сведения о ферментах рестрикции ДНК
1968	М. Мезельсон и Е. Юань	Выделена первая рестриктаза
1966	М. Ниренберг, С. Очоа, Г. Корана	Расшифрован генетический код
1967	М. Геллерт	Открыта ДНК-лигаза
1972 — 1973	Г. Бойер, С. Коэн, П. Берг (Стендфордский университет и Калифорнийский университет в Сан-Франциско)	Разработана технология клонирования ДНК
1974	Г. Кёлер, Ц. Милштейн	Разработан метод получения гибридомы из антителообразующей клетки и плазмоцитомы
1975 — 1977	Ф. Сэнгер, Р. Баррел, А. Максам, В. Гилберт	Разработаны методы быстрого определения нуклеотидной последовательности
1979	Г. Корана	Синтезирован ген тирозиновой супрессорной РНК
1981 — 1982	Р. Пальмитер, Р. Бринстер, А. Спрэдлинг, Г. Рубин	Получена трансгенная мышь. Получены трансгенные экземпляры дрозофилы
1993	Л. К. Эрнст, Г. Брем, И. В. Прокофьев	Получены трансгенные овцы с геном химозина



опероном *E. coli*. Формально 1972 г. следует считать датой рождения генетической инженерии.

Генетическая инженерия имеет яркую историю благодаря тому общественному резонансу, который она вызвала с самых первых своих шагов. Начало этим событиям положило послание участников Гордоновской конференции (1973) президиуму АН США, в котором говорилось о возможной опасности технологий рекомбинантных ДНК для здоровья человека. Возможные блага генетической инженерии признавались с самого начала, но разногласия по данной проблеме не затихли и сейчас. В табл. 5.1 перечислены основные этапы становления и развития генетической инженерии.

## **5.2. БИОТЕХНОЛОГИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК**

Технология рекомбинантных ДНК включает набор как новых методов, так и заимствованных из других дисциплин, в частности из генетики микроорганизмов. Эти методы существенно расширяют возможности генетических исследований. Используя технологию рекомбинантных ДНК, получают даже минорные клеточные белки в больших количествах и проводят тонкие биохимические исследования структуры и функций белков, а также осуществляют детальный химический анализ генетического материала. К наиболее важным методам биотехнологии рекомбинантных ДНК относят следующие:

1. Специфическое расщепление ДНК рестрикцирующими нуклеазами, что в значительной степени ускоряет выделение различных генов и манипуляции с ними.

2. Быстрое секвенирование всех нуклеотидов в очищенном фрагменте ДНК, позволяющее определить точные границы гена и кодируемую им аминокислотную последовательность полипептида.

3. Гибридизация нуклеиновых кислот, позволяющая с большой точностью выявить специфические нуклеотидные последовательности на основе их способности связывать комплементарные основания.

4. Клонирование ДНК, суть которого сводится к введению ДНК-фрагмента в самореплицирующийся генетический аппарат (плазмиду или вирус), который используют для трансформации бактерий. Бактериальная клетка после трансформации способна воспроизводить этот фрагмент во многих миллионах идентичных копий.

5. Генетическая инженерия, позволяющая получать модифицированные версии генов и затем внедрять их в клетки или организмы.

Технология рекомбинантных ДНК оказала существенное воздействие на всю клеточную биологию, позволяя решать такие задачи, как определение строения и функций не только белков, но и индивидуальных доменов, а также расшифровывать механизмы регуляции экспрессии генов, получать многие белки, участвующие в регуляции обменных процессов, клеточной пролиферации и развитии организма.

**Расщепление ДНК в специфических участках** нуклеотидных последовательностей осуществляется особыми ферментами — рестрикцирующими нуклеазами, способными разрушить чужеродную ДНК. Все ферменты условно можно разделить на следующие группы:

- 1) используемые для получения фрагментов ДНК;
- 2) синтезирующие фрагменты ДНК на матрице РНК;
- 3) соединяющие фрагменты ДНК;
- 4) позволяющие осуществить изменение структуры концов фрагментов ДНК;
- 5) применяемые для приготовления гибридизационных проб.

Каждый фермент, способный разрушить чужеродную ДНК, опознает в ней специфическую последовательность из 4 — 6 нуклеотидов. Соответствующие последовательности в геноме бактерий замаскированы метилированием остатков с помощью метилаз.

Согласно номенклатуре, предложенной Х. Смитом и Д. Натансоном, название рестриктазы складывается из трех букв: первая обозначает родовое название, две последующие — первые буквы вида. Например, фермент из *E. coli* обозначают как Eco или из *Haemophilus influenzae* — Hinf и т.д. Типовая или штаммовая идентификация следует за родовидовой, например, EcoRI или HindIII и т.д. В настоящее время различные фирмы выпускают более 100 разнообразных ферментов, опознающих различные последовательности нуклеотидов. Для каждого конкретного фермента они различаются по длине, первичной структуре и способу разрыва молекулы ДНК. Подавляю-

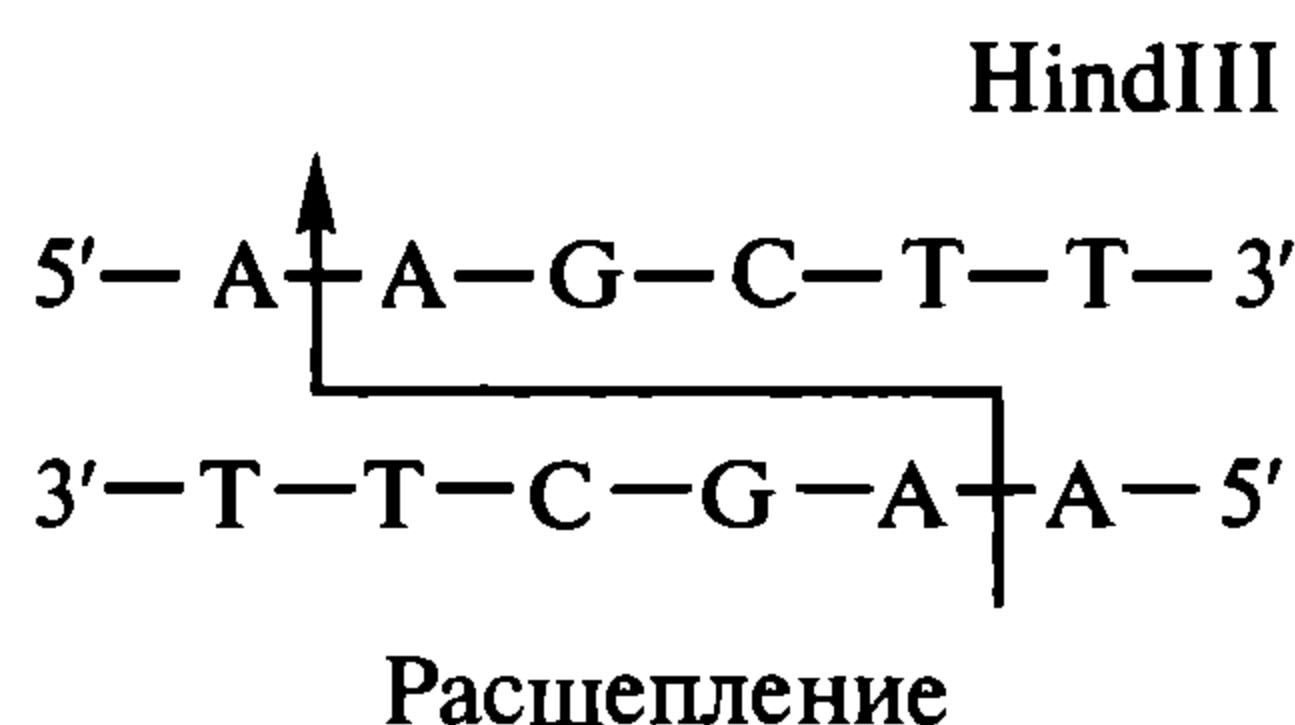
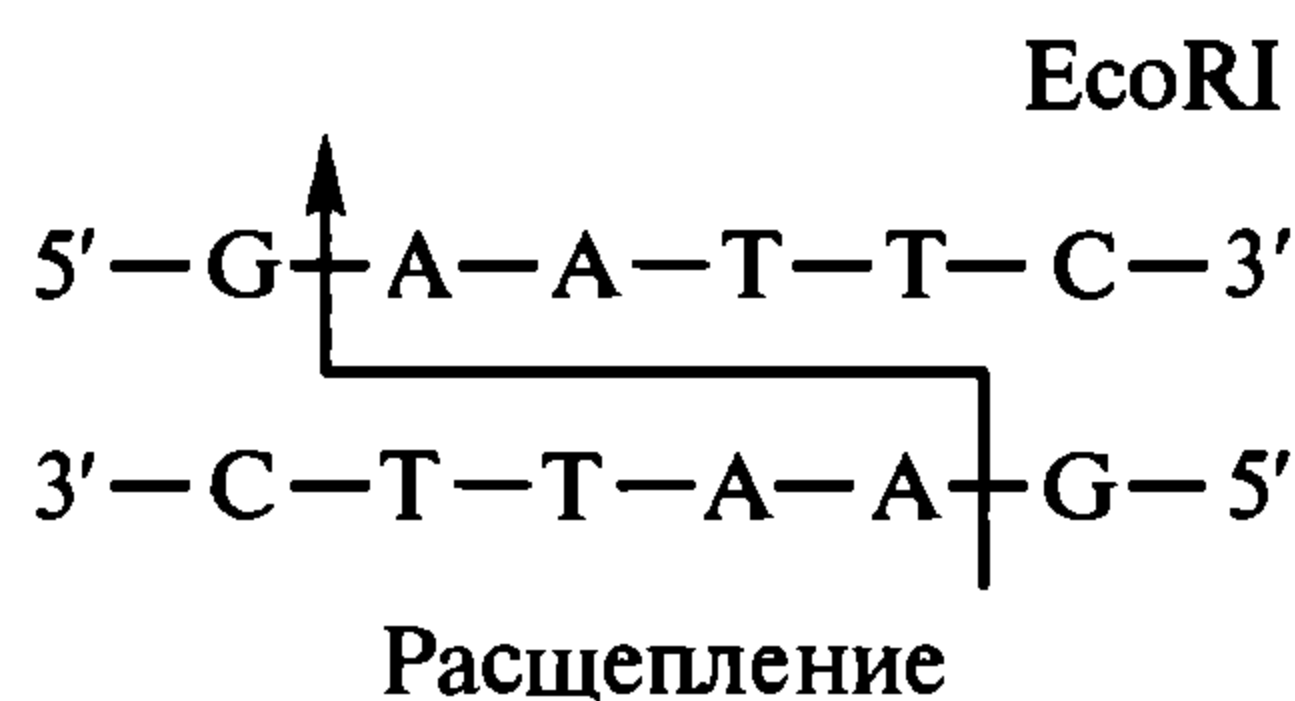
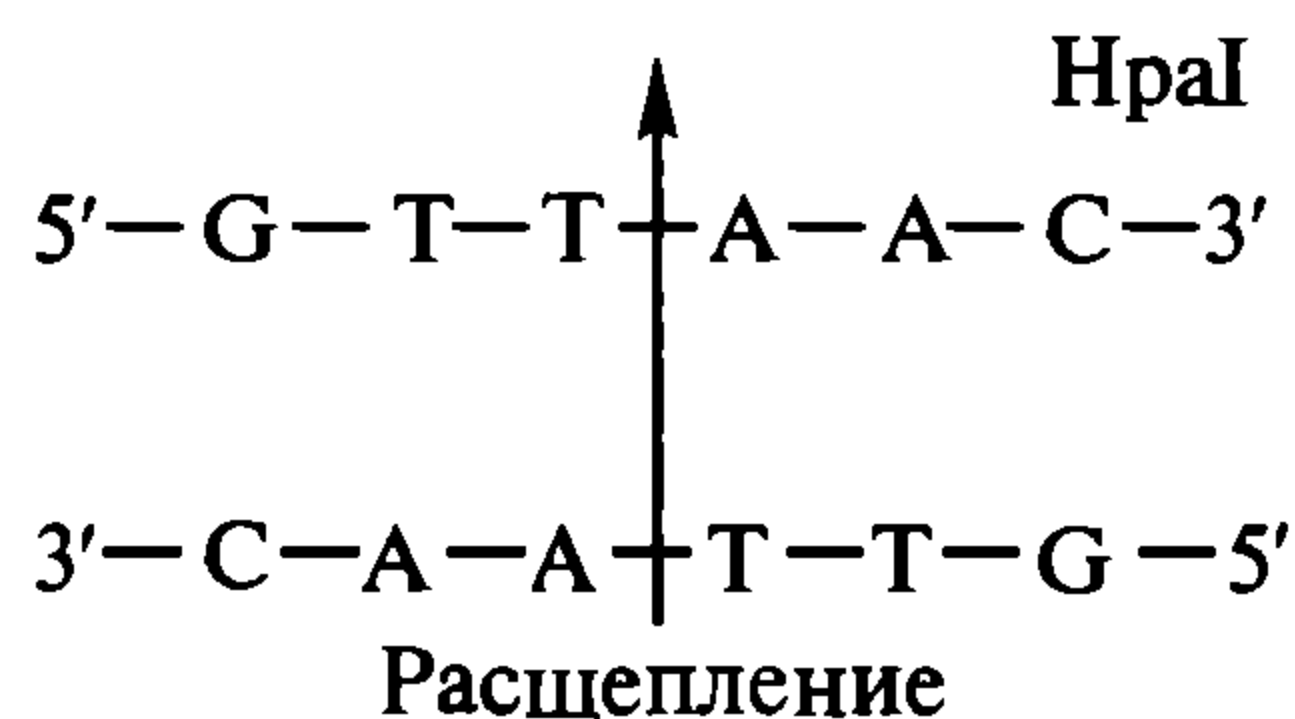


Рис. 5.1. Участки узнавания ДНК тремя рестриктазами из *Haemophilus parainfluenzae* (HpaI); *Escherichia coli* (EcoRI) и *Haemophilus influenzae* (HindIII)

щее большинство ферментов разрывает только двунитевую ДНК с образованием серии фрагментов, называемых рестрикционными (или рестриктами) с тупыми либо липкими концами (рис. 5.1).

Многие рестриктазы вносят разрывы в две цепи ДНК со смещением на несколько нуклеотидов и образованием на концах фрагментов коротких одноцепочечных участков. Они способны образовывать комплементарные пары оснований с любым другим одноцепочечным участком, полученным с помощью того же фермента («липкие» концы). Липкие концы позволяют легко соединить два любых фрагмента ДНК в одно целое. Полученный фрагмент ДНК (любого происхождения) можно встроить в очищенную ДНК плазмиды или бактериального вируса.

Сравнение размеров фрагментов ДНК после обработки соответствующего участка генома набором рестриктаз позволяет построить рестрикционную карту, отражающую расположение определенной последовательности нуклеотидов в данном участке. Сравнением таких карт можно оценить степень гомологии между отдельными генами (участками) без определения их нуклеотидной последовательности. Рестрикционные карты важны для клонирования ДНК, решения эволюционных и филогенетических задач.

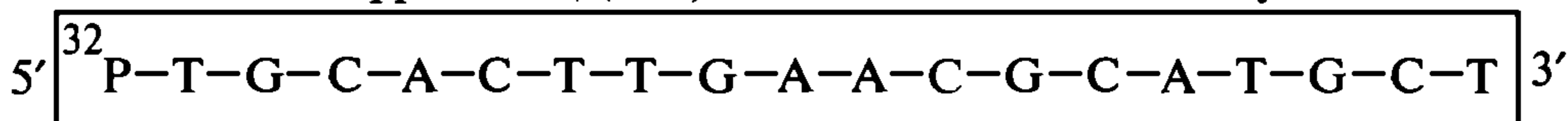
Для успешного решения задач генетической инженерии очень важно быстро секвенировать (определить последовательность нуклеотидов) любые очищенные фрагменты ДНК. В настоящее время объем информации о последовательностях ДНК столь велик, что для хранения и анализа данных о фрагментах, целых геномах необходимы новые технологии и компьютерная техника.

В биотехнологии рекомбинантных ДНК обычно используют два различных метода секвенирования ДНК: химический и ферментативный. Оба метода чрезвычайно надежны, быстры в исполнении и результативны. Результаты секвенирования позволяют также на основе генетического кода определить аминокислотную последовательность белка в соответствии с нуклеотидной последовательностью в соответствующем гене.

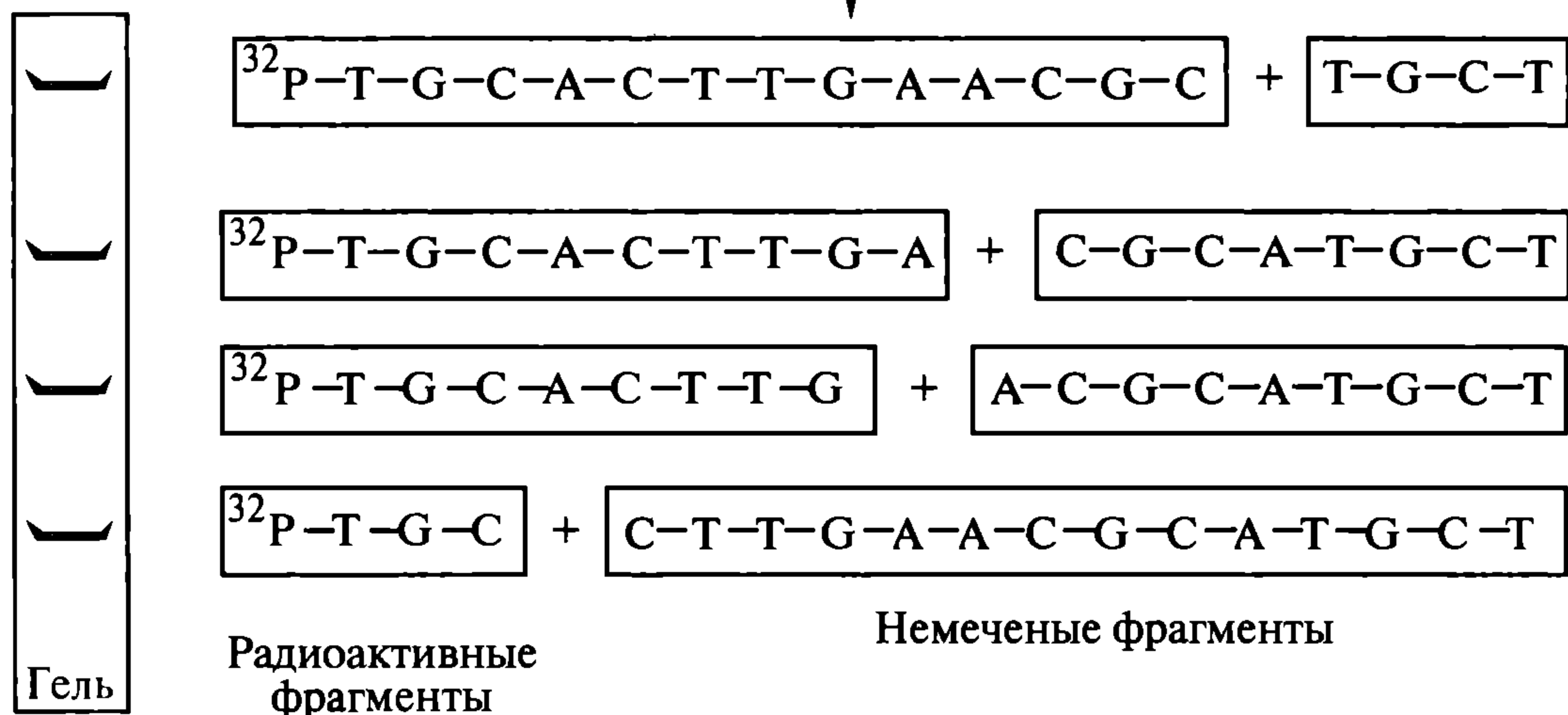
На рис. 5.2 представлена схема **химического метода секвенирования ДНК**. Исходный фрагмент ДНК, меченный  $^{32}\text{P}$  по 5'-концу, подвергается специфическому расщеплению по определенному нуклеотиду (например, А), в результате чего образуются радиоактивные фрагменты разной длины, которые разделяются по размерам при гель-электрофорезе, а радиоактивные из них выявляются с помощью радиоавтографии.

Обычно химическая процедура расщепления ДНК выполняется одновременно для четырех одинаковых проб ДНК с использованием химических агентов, расщепляющих ДНК по отдельным нуклеотидам (Т, С, G и А). Полученные образцы подвергают элек-

Исходный фрагмент ДНК, меченный  $^{32}\text{P}$  по 5'-концу



Расщепление ДНК по остаткам (A)



Электрофореграмма

Рис. 5.2. Схема получения семейства меченных по 5'-концу фрагментов ДНК в результате расщепления по определенному нуклеотиду (A)

трофорезу на параллельных дорожках одного геля, и по его результатам можно определить нуклеотидную последовательность ДНК (рис. 5.3).

**Ферментативный метод секвенирования** основан на энзиматическом введении нуклеотида, терминирующего полинуклеотидную цепь (рис. 5.4). В этом случае обычно используют дидезоксирибонуклеозидтрифосфаты, в которых дезоксирибоза-3'-ОН, представленная в нормальных нуклеотидах, отсутствует. Такой модифицированный нуклеотид, внедряясь в цепь ДНК с помощью ДНК-полимеразы, блокирует присоединение следующего нуклеотида. Синтез *in vitro* молекулы ДНК в присутствии затравки (праймера) и небольшого количества одного из таких модифицированных нуклеотидов приводит к образованию фрагментов ДНК в виде «лесенки». Если для получения таких фрагментов применять меченую ДНК (обычно проводят четыре реакции синтеза с использованием различных нуклеотидов, терминирующих цепь), а электрофоретический анализ проводить на четырех дорожках геля, то можно определить последовательность нуклеотидов. В настоящее время используют модифицированный метод, сводящийся к флуоресцентному анализу наборов фрагментов ДНК в процессе движения по одной дорожке геля.

Важнейший **метод получения рекомбинантных ДНК** основан на способности нуклеиновых кислот быстро восстанавливать

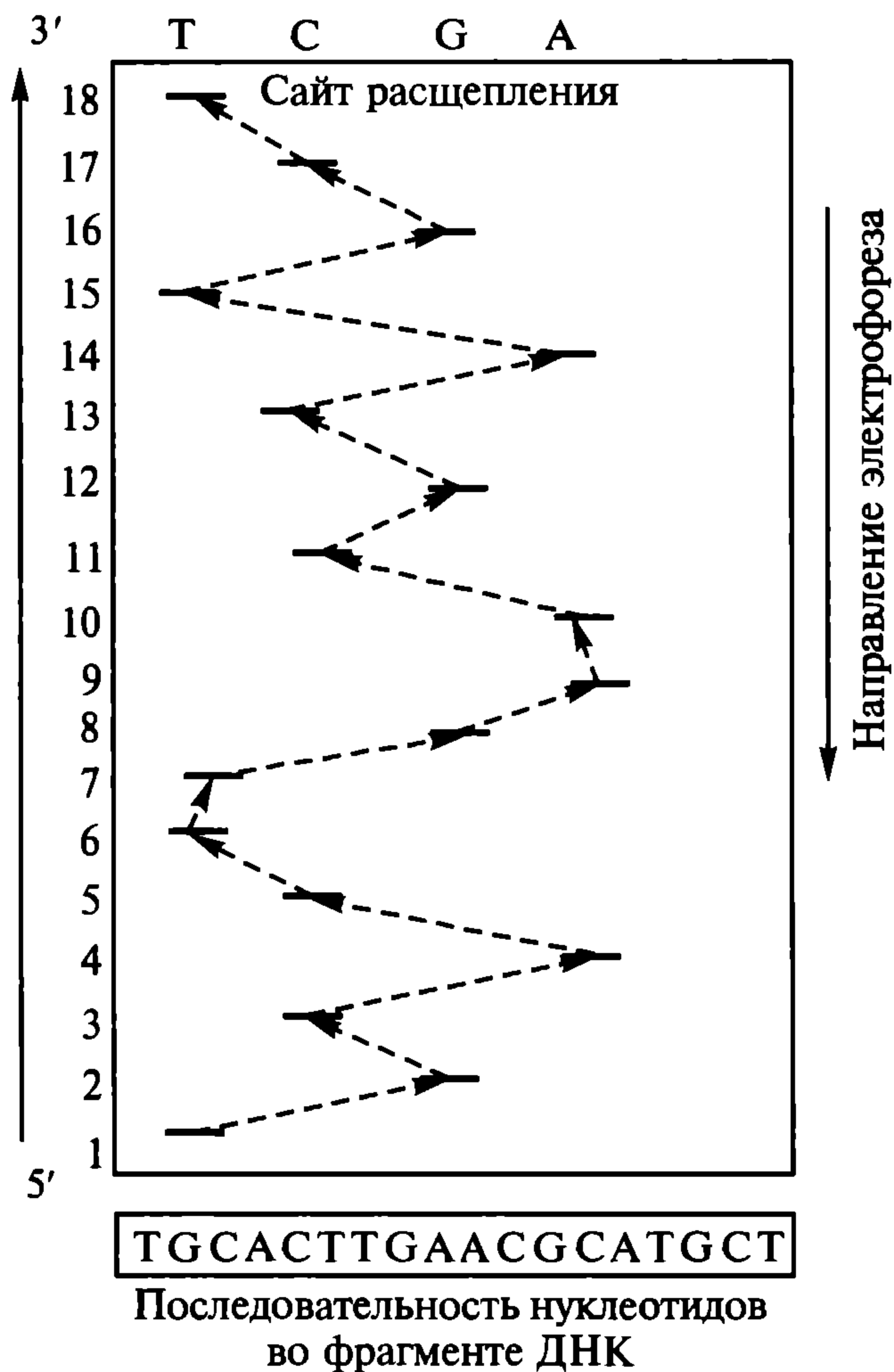


Рис. 5.3. Схема электрофореграммы, полученной с помощью химического метода секвенирования ДНК (первая снизу строка соответствует нуклеотиду на 5'-конце и является нуклеотидом Т на уровне первой дорожки. Для определения полной последовательности (отмечено пунктиром) проводят анализ послойно всех дорожек)

свою структуру после нагревания до 100 °С в сильно щелочной среде (рН 13). При нагревании до 100 °С комплементарные пары оснований разрушаются и ДНК диссоциирует на две отдельные цепи. Этот процесс назван денатурацией ДНК («плавлением»). Выдерживание комплементарных цепей при температуре 65 °С приводит к их спариванию и восстановлению структуры двойной спирали (гибридизация, ренатурация, или «отжиг»). Это свойство ДНК широко используют в химической систематике, а также для решения эволюционных и филогенетических проблем.

Скорость восстановления (ренатурации) двойной спирали зависит от вероятности столкновения двух комплементарных нуклеотидных последовательностей и их концентрации в растворе. Скорость реакции гибридизации можно использовать для определения концентрации любых последовательностей РНК или

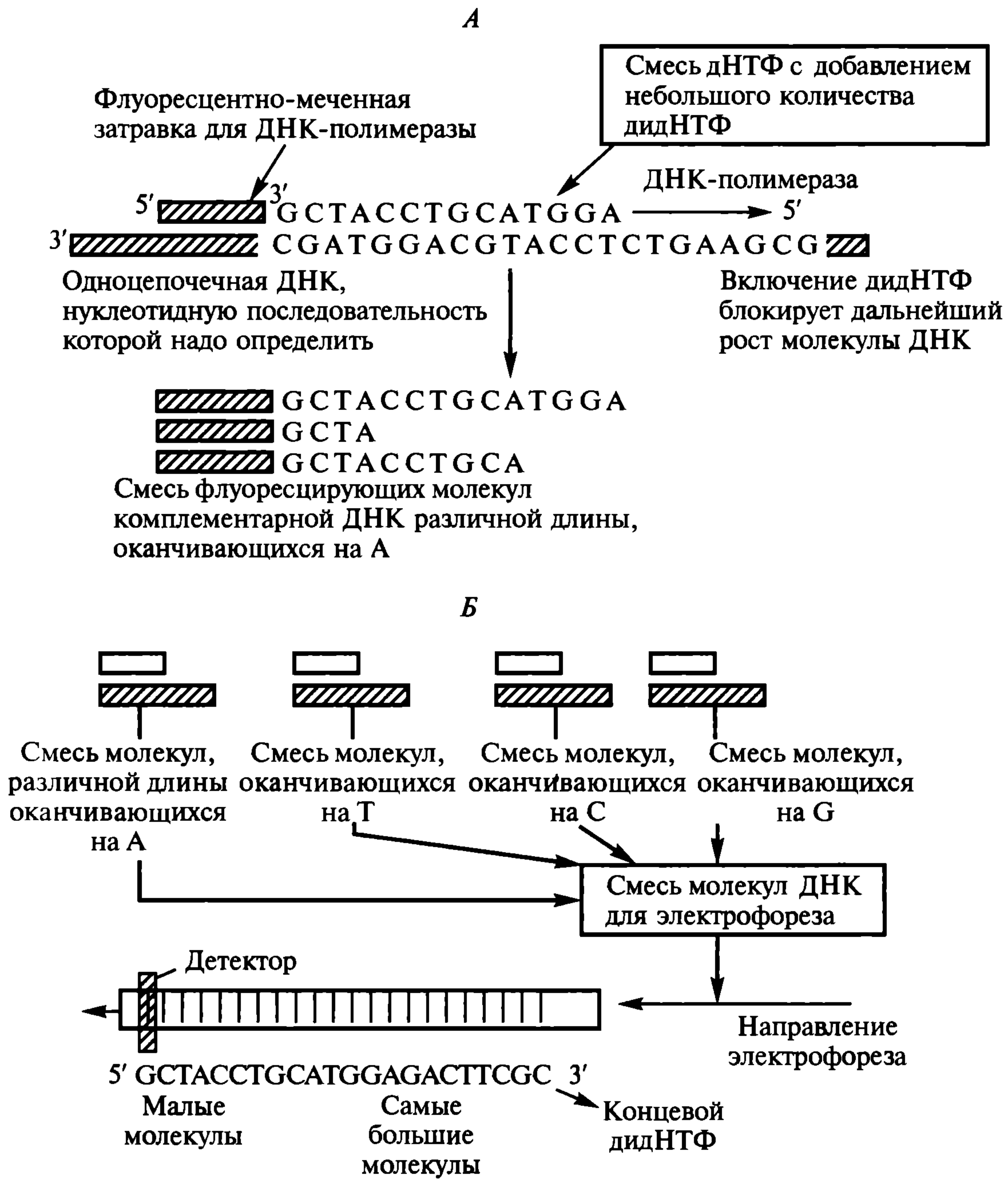


Рис. 5.4. Схема энзиматического метода секвенирования нуклеиновых кислот, основанного на энзиматическом введении нуклеотида, терминирующего цепь:

*А* — синтез *in vitro* в присутствии затравки с образованием «лесенки» фрагментов; *Б* — инкубация четырех различно окрашенных флуоресцирующих затравок в смеси нуклеотидов с добавлением различных дидНТФ, прекращающих рост цепи (А,Т,С,Г)

ДНК в смеси, содержащей и другие фрагменты нуклеиновых кислот. Для этого необходимо иметь чистый одноцепочечный фрагмент ДНК, комплементарный к тому фрагменту, который надлежит выявить. Обычно фрагмент ДНК, полученный клонировани-

ем либо химическим путем, метят по  $^{32}\text{P}$  в целях прослеживания включения фрагмента в состав дуплексов при гибридизации. Одноцепочечную молекулу ДНК, используемую в данном методе в качестве меченого индикатора, называют ДНК-зондом. Размеры его варьируют от нескольких десятков до нескольких сотен и тысяч нуклеотидов. Реакция гибридизации с использованием ДНК-зондов позволяет идентифицировать нуклеотидные последовательности в очень низкой концентрации и тем самым определять, какое количество копий последовательности ДНК, комплементарной ДНК-зонду, присутствует в геноме клетки.

ДНК-зонды применяют для поиска родственных генов; в реакциях гибридизации с РНК — для выявления экспрессии данного гена в различных клетках. Для выявления молекул нуклеиновых кислот, комплементарных всему зонду (или его участку), ДНК-зонды часто сочетают с методом гель-электрофореза, что позволяет получать информацию о размерах гибридизируемых молекул ДНК. Эффективное использование современных приборов, способных автоматически синтезировать любые нуклеотидные последовательности за короткий промежуток времени, дало возможность перестраивать гены, что представляет собой один из важных аспектов генной инженерии. Обмен генами, а также введение в клетку гена другого вида организма осуществляют посредством **генетической рекомбинации** *in vitro*. Этот подход был разработан на бактериях, в частности на *E. coli*. Он основан на важном свойстве ДНК — способности к перестройкам, изменяющим комбинацию генов в геноме и их экспрессию. Такая уникальная способность ДНК позволяет приспосабливаться данному виду к изменяющейся среде. Генетическую рекомбинацию подразделяют на два больших класса: общую рекомбинацию и сайт-специфическую рекомбинацию. В процессе общей рекомбинации генетический обмен в ДНК происходит между гомологичными нуклеотидными последовательностями, например между двумя копиями одной и той же хромосомы в процессе мейоза (кроссинговера), или при скрещивании и перегруппировке генов у бактерий.

В процессе сайт-специфической рекомбинации в обмен вступают короткие специфические нуклеотидные последовательности одной и той же или обеих спиралей ДНК, распознаваемые особым сайт-специфическим ферментом, что приводит к трансформации распределения нуклеотидных последовательностей в геноме. Любые комплементарные взаимодействия между двумя гомологичными спиралями ДНК возможны лишь тогда, когда в одной из двух цепей происходит разрыв. К числу факторов, вызывающих такие одноцепочечные разрывы, относят химические агенты, некоторые виды излучения, специфические белки. Например, у *E. coli* обнаружен белок *гес* BCD, который вызывает в молекулах



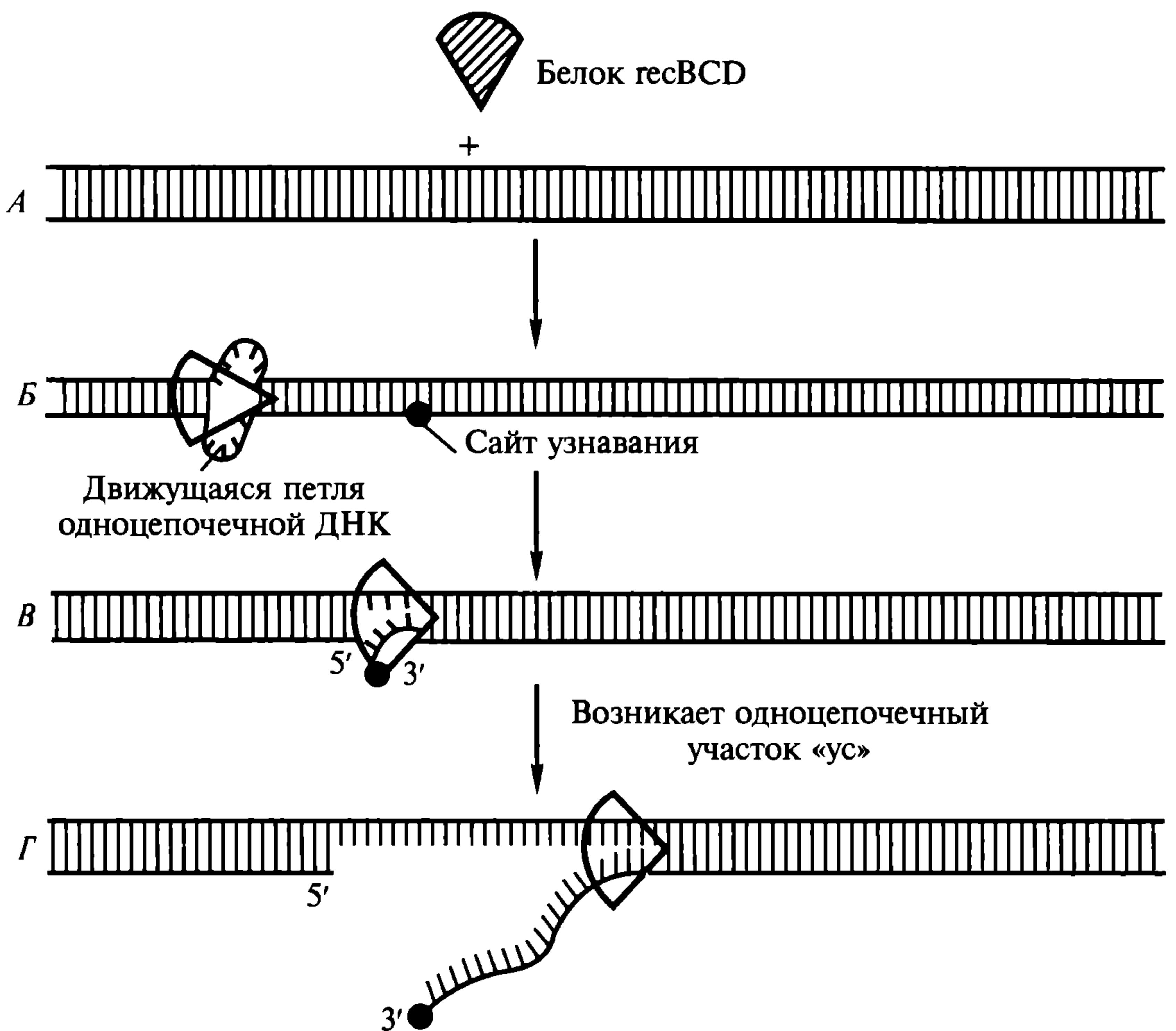


Рис. 5.5. Схема процесса общей рекомбинации с участием белка гесBCD у *E. coli*:

А — двойная спираль ДНК; Б — присоединение к двойной спирали белка гесBCD с последующим его перемещением; В — возникновение разрыва в сайте узнавания; Г — образование одноцепочечного участка «ус»

ДНК одноцепочечные разрывы. Белок гесBCD представляет собой ДНК-зависимую АТРазу, которая действует как ДНК-хеликаза, перемещающаяся по спирали ДНК и вызывающая ее расплетение. Под влиянием этого белка, обладающего нуклеазной и хеликазной активностью, на двойной спирали ДНК возникает разрыв с образованием одноцепочечного участка «ус» (whisker) (рис. 5.5).

Белок гесBCD присоединяется к двойной спирали ДНК с одного конца (5') и со скоростью около 300 нуклеотидов в секунду движется вдоль спирали ДНК за счет гидролиза АТФ. Одновременно с белком движется и возникшая петля ДНК. Когда петля на спирали достигает участка, называемого сайтом узнавания (recognition site), одна из цепей разрывается с освобождением небольшого одноцепочечного участка «ус». Возникший «ус» инициирует дальнейшую генетическую рекомбинацию.



Рис. 5.6. Схема начального одноцепочечного обмена между двумя гомологичными двойными спиралями ДНК в процессе общей рекомбинации

В процессе общей генетической рекомбинации центральная роль отводится комплементарным взаимодействиям нуклеотидных последовательностей. Кроме того, этот процесс требует уча-

стия особого белка гесА с Mr, равной 38 кДа. Белок гесА прочно связывается в виде крупных кластеров с одиночными цепями ДНК, одновременно удерживая и двойную спираль. За счет двух сайтов данный белок имеет еще один участок — для связывания и гидролиза АТР, т. е. он представляет собой ДНК-зависимую АТРазу. Благодаря особенностям белка гесА осуществляются одноцепочечный обмен между двумя двойными спиралями (рис. 5.6) с удалением некоторого количества нуклеотидов и локальный ресинтез ДНК.

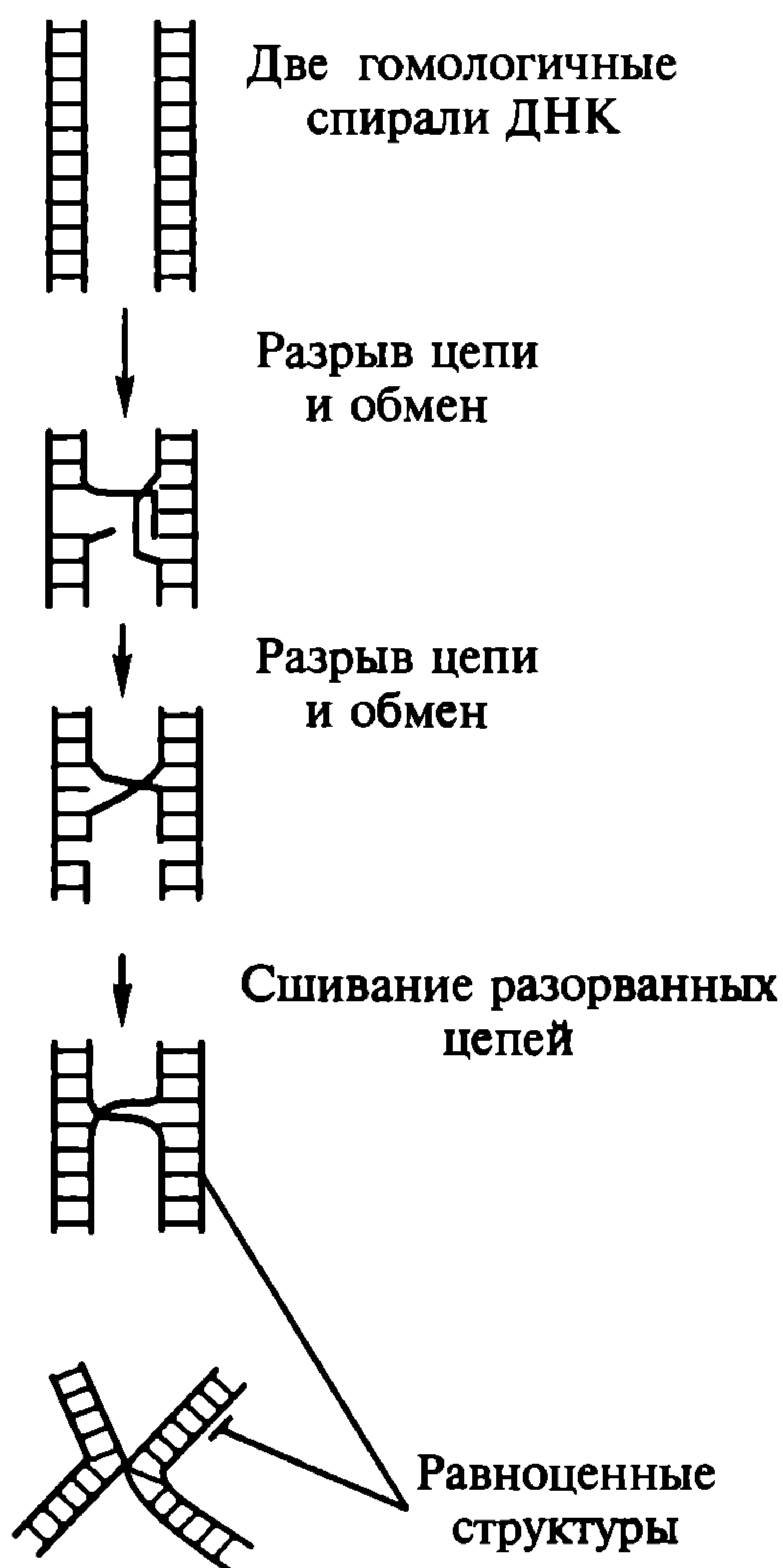


Рис. 5.7. Схема образования структуры с перекрещиванием цепей между двумя спиралями ДНК

Разрыв в одной из цепей ДНК высвобождает эту цепь, и она внедряется во вторую спираль, образуя короткий спаренный участок. После начального обмена гомологичные нуклеотидные последовательности двух взаимодействующих спиралей устанавливаются в строгом соответствии одна с другой, в связи с чем происходит расширение области спаривания и быстрый обмен между спиралями. Для этого процесса разные организмы используют неодинаковые механизмы, большинство из которых включает в качестве проме-

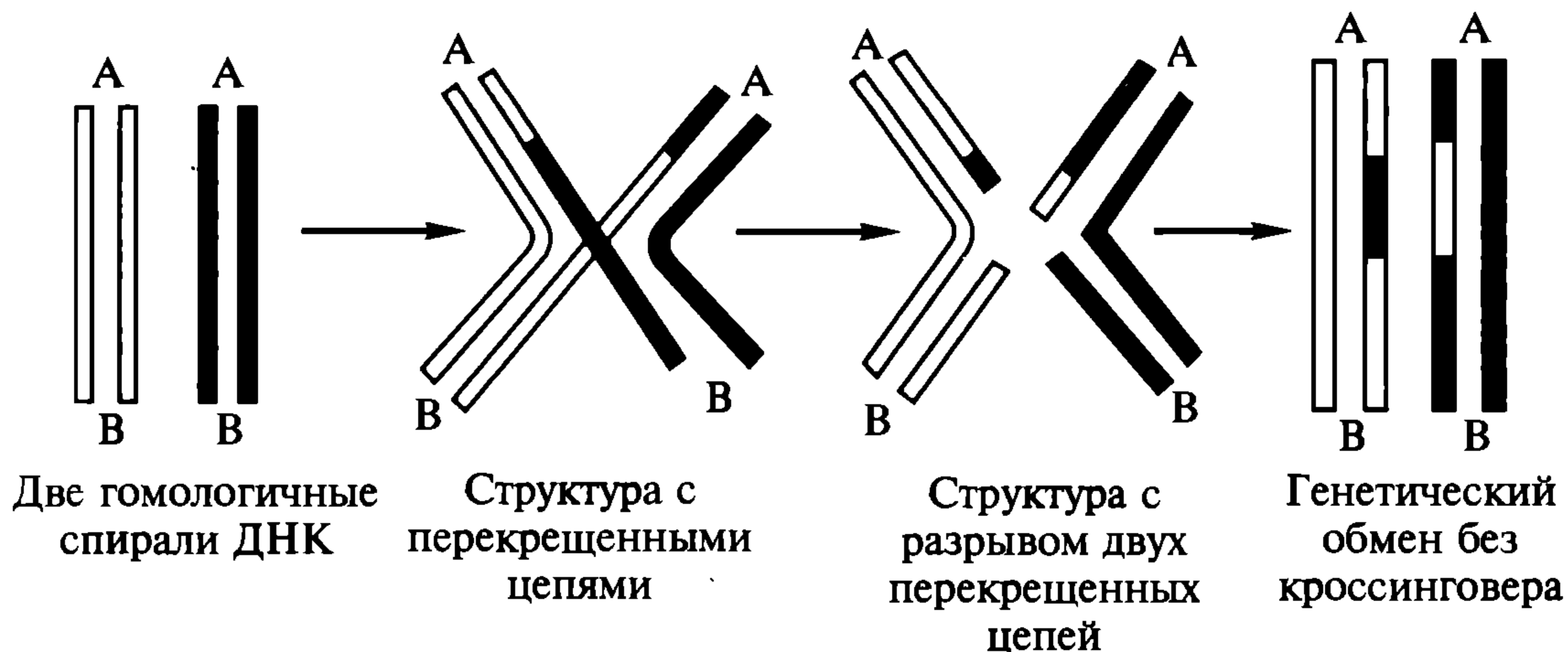


Рис. 5.8. Схема генетического обмена между двумя гомологичными спиралями ДНК без кроссинговера

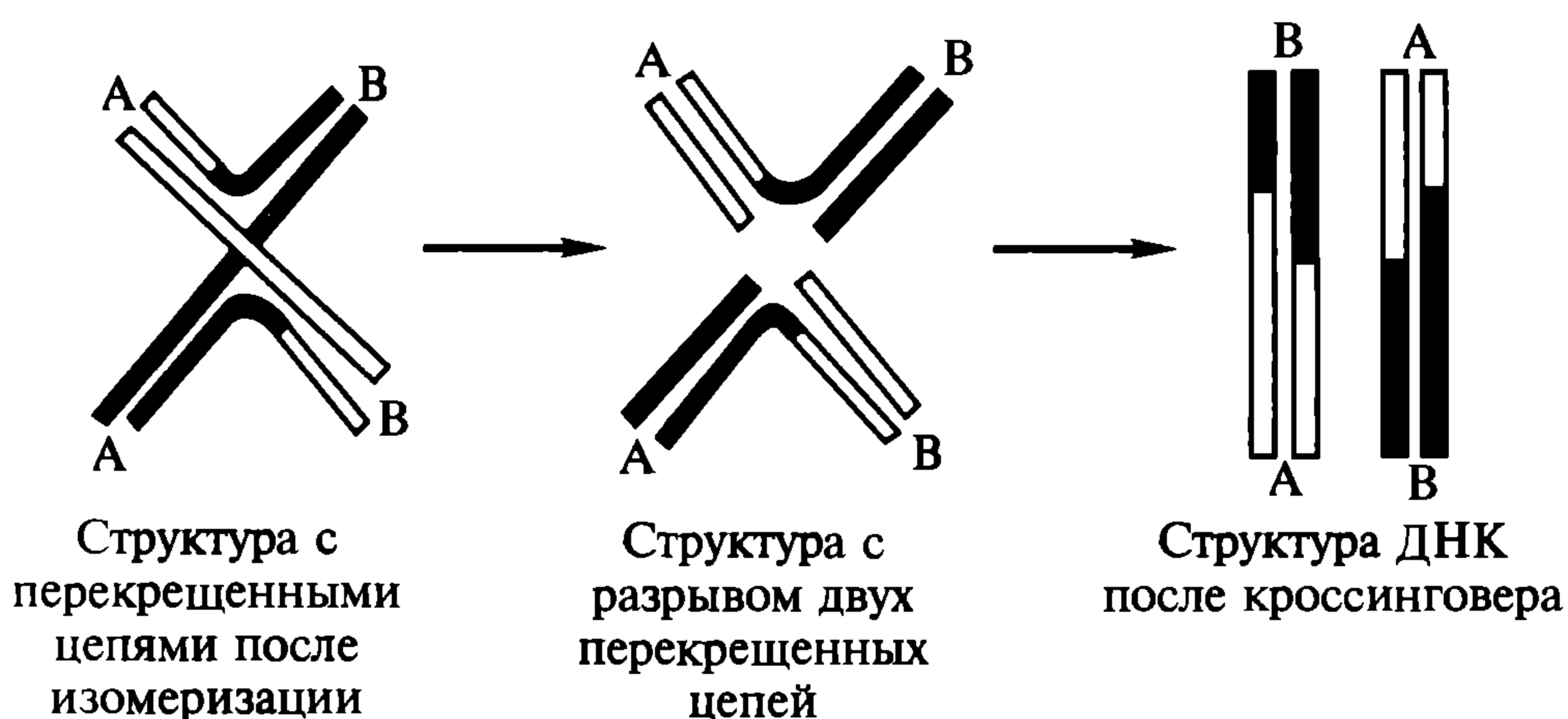


Рис. 5.9. Схема образования молекулы ДНК после изомеризации перекрещенных цепей и кроссинговера

жуточного этапа обмен с перекрещиванием цепей между двумя спиралями ДНК (рис. 5.7).

Структура, образующаяся при обмене с перекрещиванием цепей, содержит две перекрещенные и две неперекрещенные цепи. Она способна существовать в различных изомерных формах. Изомеризация меняет положение двух пар цепей: две ранее перекрещивающиеся цепи становятся неперекрещивающимися и наоборот.

Для того чтобы восстановились две отдельные спирали ДНК и тем самым прекратился процесс спаривания, в каждой из двух перекрещенных цепей должен произойти разрыв (рис. 5.8).

В случае изомеризации одной из цепей (поворота на  $180^\circ$ ) разрыв перекрещенных цепей дает две кроссоверные хромосомы (рис. 5.9).

### 5.3. КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ДНК

Сущность генетической инженерии сводится к целенаправленному конструированию генетических систем вне организма с последующим введением их в живой организм. При этом рекомбинантные ДНК становятся составной частью генетического аппарата реципиентного организма и, кроме того, они приносят в него новые генетические и физиолого-биохимические свойства, полезные для человека. К числу таких свойств можно отнести синтез аминокислот и белков, гормонов, ферментов, витаминов и др.

Один из важных этапов конструирования молекулы ДНК — лигирование (или сшивание) генов с помощью фермента ДНК-лигазы. Сшивание фрагментов ДНК, содержащих нужные гены, осуществляют двумя основными методами: а) по «липким» концам; б) с помощью искусственно достроенных «липких» концов.

*Сшивание генов* (фрагментов) ДНК по «липким» концам, т. е. взаимнокомплементарным участкам, длиной из 4 — 6 пар нуклеотидов, достаточно легко осуществляется ферментом ДНК-лигазой с образованием ковалентной фосфодиэфирной связи между соседними нуклеотидами:



Сшивание ↓ ДНК-лигаза



При отсутствии комплементарных «липких» концов у сшиваемых фрагментов их достраивают, т. е. синтезируют искусственно ферментативным путем. Для этой цели применяют так называемые линкеры (или «переходники») — короткие участки ДНК, имеющие разные «липкие» концы:



Фрагмент 1

Линкер

Фрагмент 2

Линкерные фрагменты не только обеспечивают объединение генов, но и обуславливают их экспрессию, в связи с чем часто в середину линкера помещают какой-либо регуляторный генетический элемент, например промотор, или участок связывания с рибосомой.

Возможно сшивание фрагментов и по тупым концам, когда концы фрагментов двунитевые:



В этом случае реакция лигирования имеет биохимические особенности и ее эффективность ниже, чем при сшивке по «липким» концам.

После того как рекомбинантная ДНК сшита, ее вводят в живые клетки. Но поскольку она не способна к самовоспроизведению, ее разрушают внутриклеточные нуклеазы. Для того чтобы рекомбинантная ДНК стала составной частью генетического аппарата клетки, она должна либо встроиться (интегрироваться) в ее геном и реплицироваться за его счет, либо быть способной к автономной репликации. Принято молекулы ДНК, способные акцептировать чужеродную ДНК и автономно реплицироваться, называть *векторными молекулами*. К числу векторов относят плазмиды, бактериофаги, вирусы животных. Векторы должны обладать следующими особенностями:

- 1) иметь субстратные участки для определенных эндонуклеаз рестрикции;
- 2) иметь свойства репликона;
- 3) содержать один или несколько маркерных генов, которые после проникновения вектора в клетку придают ей фенотип, свидетельствующий о присутствии вектора.

В частности, для бактериальных векторов в качестве маркерных генов чаще всего используются гены, вызывающие устойчивость клеток к некоторым антибиотикам.

Таким образом, все векторы обеспечивают репликацию встроенных генов, их экспрессию, интеграцию в хромосому клетки и т. д. Чаще других в генетической инженерии в качестве векторов используют плазмиды. *Плазмидами* называют бактериальные репликоны (внехромосомные элементы наследственности), стабильно наследуемые. Они представляют собой двуцепочечные кольцевые молекулы ДНК с переменными молекулярными массами. По размеру они соответствуют 1 — 3 % генома бактериальной клетки. Так, молекулярная масса одной из самых мелких плазмид, найденных у *E. coli*, составляет 1,5 МДа, а клетки псевдомонад содержат плазмиды с Мг около 300 МДа, что составляет 15 % от Мг хромосом этих бактерий. Плазмиды разделяют на конъюгативные, способные сами перенестись в реципиентные клетки с помощью конъюгации, и неконъюгативные, не обладающие этим свойством. Они детерминируют разные свойства: резистентность к антибиотикам (R-плазмиды); биodeградацию (D-

плазмиды) и др. Например, плазмиды стафилококков несут гены устойчивости к пенициллину, соединениям ртути и др. Гены устойчивости к тяжелым металлам обнаружены также в составе R-плазмид *E. coli*. Плазмиды могут управлять синтезом инсектицида в клетках *Bacillus thuringiensis*. F-плазида *E. coli* или FR-плазмиды псевдомонад являются половыми факторами. Плазида pS101 с Mr 5,8 МДа несет ген устойчивости к тетрациклину (селективный маркер). У различных микроорганизмов — *E. coli*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Saccharomyces* обнаружены Col-плазмиды, обеспечивающие синтез разных колицинов — высокоспецифических антибиотиков, подавляющих жизнедеятельность других штаммов микроорганизмов того же вида или родственных видов. Количество плазмид в клетке может колебаться от одной до более ста. В целом чем крупнее плазида, тем меньше количество ее копий в клетке.

Первый плазмидный вектор был получен С.Коэном (1973). Его источником была плазида *E. coli* R<sub>6-5</sub> с Mr 65 кДа. Плазида стала родоначальником серии векторов и других структур. Особое место в генетическом манипулировании занимает плазида, относящаяся к группе колициногенных плазмид *E. coli*. ColE1 реплицируется независимо от хромосомы и присутствует в количестве примерно 24 копий на клетку. Ее широко используют благодаря селективному маркеру в качестве вектора для клонирования фрагментов про- и эукариотической ДНК в *E. coli*.

Плазида ColE1 (Mr 4,2 МДа) применяется для клонирования EcoRI-фрагментов. При этом интеграция чужеродного фрагмента в участок узнавания EcoRI ведет к фенотипическому изменению клетки, прекращению синтеза колицина с сохранением иммунитета к нему. Этот признак используют при отборе рекомбинантных трансформантов.

Плазида pBR313 содержит уникальные участки расщеплений нескольких рестриктаз: EcoRI, HindIII, BamHI, SalI, XmaI и HpaI. Конструируя рекомбинантную ДНК, в эти участки можно встраивать фрагменты чужеродной ДНК, полученные с помощью соответствующих рестриктаз. На рис. 5.10 изображена схема расположения генов в плазмиде pBR322. Плазида pBR322 содержит два гена, программирующих устойчивость к двум различным антибиотикам — тетрациклину (ген tet) и ампициллину (ген bla). В гене tet находятся уникальные участки расщепления рестриктазами HindIII, BamHI и SalI, а в гене bla — участок расщепления PstI. Если разрезать плазмиду любой из рестриктаз, участок расщепления которой находится в гене tet, и соединить ее методом «липких» концов с чужеродным фрагментом ДНК, то в полученной рекомбинантной молекуле останется нетронутым только ген bla, а ген tet утрачивает свою активность, так как его целостность

нарушается вставкой. Напротив, при разрезании плазмиды рестриктазой PstI и внедрении в этот участок фрагмента ДНК инактивируется ген bla, тогда как ген tet продолжает кодировать белок, обеспечивающий устойчивость *E. coli* к тетрациклину. Плазмидные векторы в настоящее время чрезвычайно разнообразны за счет следующих свойств:

уменьшения размеров плазмиды вследствие изъятия участков, не обязательных для репликации (чем больше плаزمида содержит уникальных участков узнавания для рестриктаз, тем она универсальнее);

гибридизации векторов одного рода с другими векторами или природными плазмидами (например, получены *гибридные векторы* комбинацией плазмиды и фага  $\lambda$ ; при этом вновь сконструированная рекомбинантная ДНК должна сохранить репликационные свойства исходной плазмиды;

использования новых плазмид;

применения транспозонов;

создания векторов с генетическими маркерами, позволяющими вести отбор рекомбинантных клонов.

*Эукариотические вирусы* до сих пор нашли более скромное применение в качестве векторов. Практически используются только онкогенный вирус SV 40 и его производные. Все эти векторы — дефектные вирусы, не способные давать полноценные вирусные частицы в клетке хозяина. Анализируемую ДНК мож-

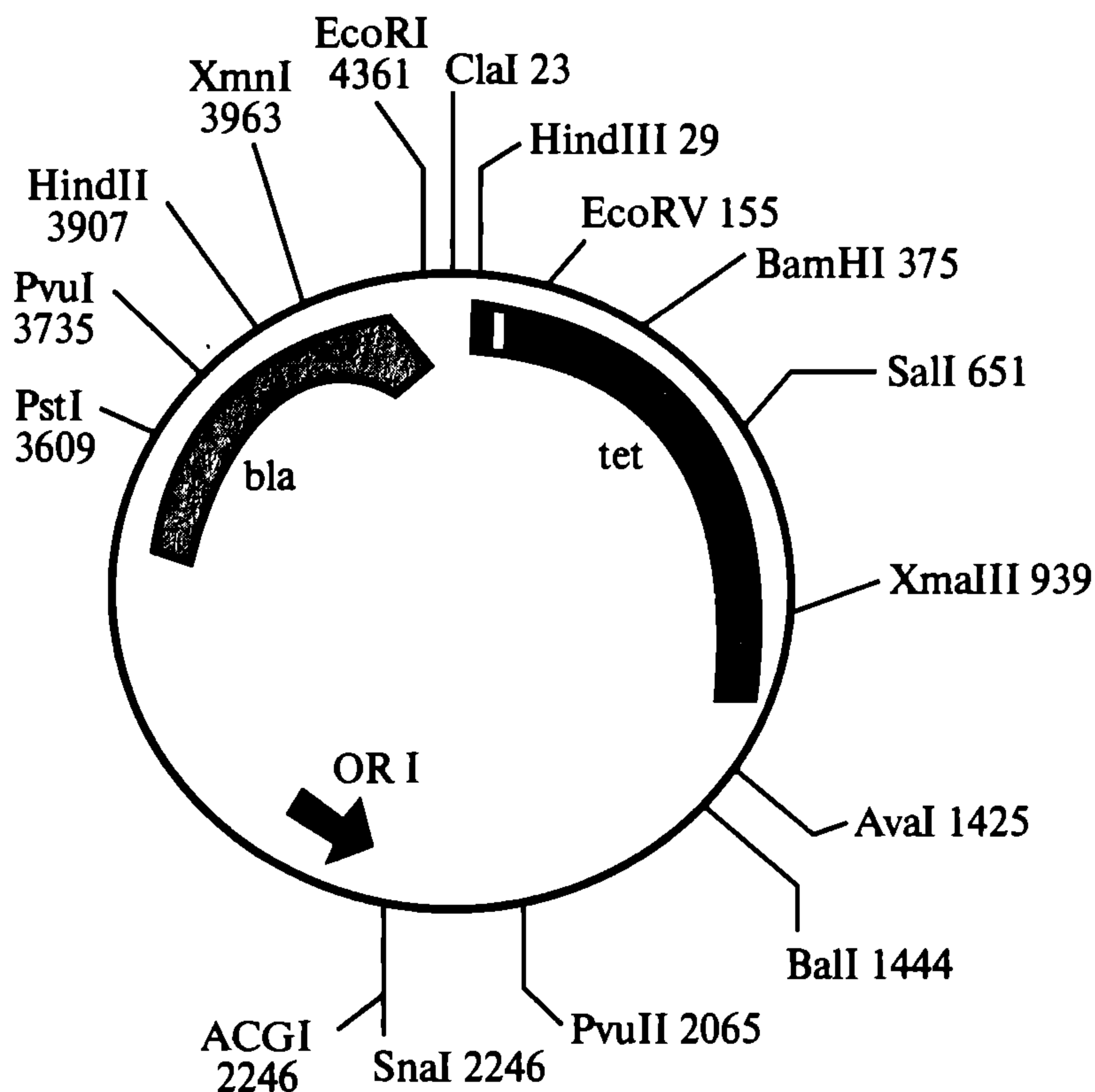


Рис. 5.10. Схема строения плазмиды pBR322



но вводить и в другие репликоны, способные размножаться в клетках, например бактериофаги. Чаще всего из известных фагов в качестве векторов применяют сконструированные производные фага  $\lambda$  и фагов M13 и fd. В векторах на основе бактериофага  $\lambda$  используется его особенность, состоящая в том, что большая часть его ДНК не участвует в размножении фага в клетке. Это позволяет вводить чужеродную ДНК в ДНК фага  $\lambda$  в качестве вектора.

Фаг M13 — это одноцепочечная циклическая ДНК длиной около 6 500 нуклеотидов. После инфицирования бактериальной клетки одноцепочечная ДНК фага превращается в двуцепочечную репликативную форму (RF), которая подобна плазмиде. Фаговая ДНК содержит, кроме того, короткий участок из 500 нуклеотидов, названный как МП (межгенная последовательность), не существенный для ее жизнедеятельности. Именно в этот участок МП репликативной формы ДНК после расщепления ее с помощью лигазы вставляют чужеродную ДНК. Введение рекомбинантной двуцепочечной молекулы в клетку *E. coli* приводит к ее репликации, синтезу (+) цепи, упаковке последней в белковый чехол и выделению фага в среду. Инфицированная нитевидным фагом клетка продолжает делиться, выделяя в окружающую среду большое количество фага. Этот фаг содержит в вирионе одноцепочечную циклическую ДНК, в которую встроена одна из цепей чужеродной ДНК.

Векторные плазмиды и векторные вирусы со встроенными чужеродными генами часто называют *гибридными* (или *химерными*) *плазмидами* (или фагами).

Одним из типов гибридных векторов служат *космиды* (Cos-сайт), которые, используя плазмидный тип репликации, обладают способностью упаковываться *in vitro* в оболочки частиц фага. Космида содержит принадлежащие плазмидной ДНК уникальные эндонуклеазные сайты и селективные маркеры, объединенные с сегментом ДНК фага за счет «липких» концов. Примером может служить космида, сконструированная на основе фага  $\lambda$  и плазмиды EcoRI. Cos-сегменты фага  $\lambda$  получают путем расщепления конкатемерной ДНК фага (конкатемер — предшественник упаковки вирусной ДНК в зрелые фаговые частицы) соответствующими эндонуклеазами. Эти сегменты включают в плазмидный вектор. Большинство космидных векторов для клонирования способны включать вставки ДНК размером до 45 тыс. п.н. Реципиентные клетки-хозяева более эффективно инфицируются космидами, чем при использовании плазмидной ДНК. На 1 мкг ДНК с Cos-сайтами можно получить от  $1 \cdot 10^4$  до  $5 \cdot 10^5$  колоний трансформированных клеток. В клетке-хозяине старая ДНК трансформируется и сохраняется в виде плазмиды.

Другой представитель гибридных векторов — *фазмиды*. Это дуплексные молекулы ДНК, у которых концы представляют со-

бой сайты фага  $\lambda$ , содержащие гены, необходимые для осуществления лизиса клетки, а средняя часть является линейаризованной плазмидой. В фазмидах полностью сохранены функции репликации как фага, так и плазмиды. Фазмида содержит несколько тандемных повторов сегмента плазмиды для обеспечения успешной упаковки ДНК и замены в ней вставок в процессе конструирования рек-молекул. Фазмидные ДНК упаковываются *in vitro* перед инфекцией. В клетке-хозяине фазмида реплицируется как фаговая ДНК. При наличии в векторной молекуле гена, кодирующего репрессор фага  $\lambda$ , фазмида реплицируется как плазида. Примечательно, если ген кодирует мутантный белок *cI*, инактивирующийся при повышенной температуре, то фазмида способна реплицироваться как плазида при низкой температуре и как фаг при повышении температуры до 42 °С.

Векторы на основе плазмид и фагов способны реплицироваться в клетках разных хозяев в отличие от обычных плазмид и бактериофагов, эволюционирующих синхронно с природными «хозяевами». Реплицирование с использованием гибридного вектора осуществить значительно проще в клетках как природного, так и альтернативного хозяина. *Челночные векторы* содержат две области ДНК, соответствующие каждому из двух видов хозяев, а также гены, необходимые для репликации и не поставляемые клетками хозяина. Число векторов, сконструированных с помощью технологии рекомбинантных ДНК, довольно велико. Одни из таких векторов способны действовать попеременно в клетках двух разных видов прокариот, другие — как в прокариотической (чаще *E.coli*), так и в эукариотической клетке (дрожжевых, растительных, животных).

После конструирования рекомбинантные ДНК с помощью трансформации вводят в реципиентный организм: бактериальную, грибную, растительную или животную клетку. Трансформация предусматривает предварительную обработку клеток соединениями, обуславливающими проникновение ДНК внутрь клеток с последующим их помещением в среду, в которой способны существовать только клетки, получившие векторную молекулу, например в среду с определенным антибиотиком.

Процесс инфицирования клеток с помощью чужеродных ДНК, приводящий к образованию зрелого фагового потомства, назван трансфекцией.

Практически общий способ трансформации и трансфекции основан на том, что при обработке клеток бактерий  $\text{CaCl}_2$  их мембрана становится проницаемой для ДНК. Однако эффективность проникновения экзогенной ДНК в клетку довольно низка. Поэтому среди бактерий, подвергшихся трансформации, только небольшая часть оказывается трансформированной. Отделение ее от

общей массы осуществляется в процессе клонирования. Для клонирования бактериальную суспензию определенной концентрации выливают на твердую питательную среду, например на агар с питательными добавками, в чашки Петри из расчета 5—10 бактерий на 1 см<sup>2</sup> поверхности. Бактериальная клетка на поверхности агара начинает делиться с образованием в итоге маленькой колонии, похожей на шляпку гриба. Эта колония называется *клоном*, причем из каждой клетки образуется свой клон, все клетки которого имеют свойства бактерии-родоначальника.

Отбор бактерий-трансформантов можно продемонстрировать, используя плазмиду pBR322 (см. рис. 5.10), содержащую два гена устойчивости к тетрациклину и ампициллину. Для отбора этих бактерий в агар добавляют антибиотик — или ампициллин, или тетрациклин в зависимости от того, какой из генов (*bla* или *tet*) остался интактным после введения чужеродной ДНК. На такой среде клоны образуют клетки только с плазмидами. Для отделения рекомбинантных бактерий часть материала каждого клона переносят на другую чашку Петри, содержащую антибиотик, ген устойчивости к которому был разрушен при создании рекомбинантов. На этих чашках Петри дают клоны только те бактерии, которые содержат исходную плазмиду, а рекомбинантные бактерии их не образуют. Такая тщательная селекция клонов по устойчивости к антибиотику позволяет идентифицировать рекомбинантные клоны. При поиске рекомбинантных клонов успешно применяют метод автордиографии.

Рекомбинантные клоны могут быть идентифицированы и по синтезируемому ими продукту. Но чаще приходится идентифицировать непосредственно нуклеотидную вставку с использованием методов гибридизации. С этой целью бактериальные колонии выращивают на нитроцеллюлозных фильтрах, помещенных на чашку Петри с питательной средой. Далее готовят реплики: к фильтру с исходными колониями прижимают свежий нитроцеллюлозный фильтр, который затем переносят на чашку Петри с плотной питательной средой, где образуются колонии, идентичные первым.

Затем фильтр-реплику подвергают щелочной обработке, при этом клетки в колониях лизируют и денатурированная ДНК из клеток связывается с нитроцеллюлозой в том участке, где была расположена соответствующая колония. При радиоактивной ДНК или РНК (меченной <sup>32</sup>P или <sup>125</sup>I) выдерживание фильтра в растворе, содержащем радиоактивный полинуклеотид, приводит к гибридизации с комплементарными последовательностями. В итоге те участки фильтра, в которых находились рекомбинантные клоны с требуемой вставкой, оказываются радиоактивными и идентифицируются радиоавтографически.

## 5.4. ЭКСПРЕССИЯ ЧУЖЕРОДНЫХ ГЕНОВ

Эффективность функционирования бактериальных генов неодинакова, что обуславливает вариабельность концентрации отдельных белков в зависимости от их функций. Такие вариации белков, например у *E. coli*, обусловлены системой контроля генной экспрессии, осуществляемой в основном на уровне транскрипции ДНК, и зависят от количества синтезируемой на данном гене мРНК и активности фермента РНК-полимеразы. Порядок в чередовании нуклеотидных последовательностей в промоторном участке структурного гена определяет степень активности РНК-полимеразы и инициацию процесса транскрипции. Бактериальные гены, включенные в геном, как правило, экспрессируются достаточно легко, давая мРНК и белок в силу того, что в сигнальных последовательностях, управляющих процессами транскрипции и трансляции у различных прокариотических организмов, много общих черт. Что касается экспрессии генов эукариот в бактериях, то она происходит крайне редко, если не создавать специальные условия, поскольку регуляторные участки эукариот отличны от таковых у бактерий. Регуляторные (сигнальные) участки не узнаются бактериальными РНК-полимеразами, что приводит к замедлению транскрипции. При клонировании геномной ДНК эукариотической клетки экспрессия генов не происходит из-за отсутствия у бактерий системы сплайсинга. Следовательно, для экспрессии эукариотических генов в клетках прокариот необходимо, чтобы данные гены находились под контролем прокариотических регуляторных элементов. В связи с этим для осуществления экспрессии эукариотического гена соответствующая кДНК (или синтетическая ДНК), содержащая кодирующую последовательность, в составе векторной молекулы (например, плазмиды) присоединяется к регуляторным элементам бактерии-промотора, оператору и рибосом-связывающему участку.

Таким образом, в сконструированных промежуточных рекомбинантных ДНК эукариотический ген будет находиться под контролем бактериальных регуляторных элементов. Целесообразнее встраивать ген в подходящий вектор для экспрессии, который уже содержит регуляторные элементы, способствующие активной экспрессии встроенного гена после введения рекомбинантной плазмиды в бактериальную клетку. Например, к таким эффективным регуляторным участкам принадлежит промотор гена  $\beta$ -лактамазы (ген устойчивости к ампициллину, входящий в состав плазмиды pBR322). Промотор гена  $\beta$ -лактамазы нерегулируемый, а использование таких промоторов не всегда удобно, так как синтезированные белки в большом количестве могут блокировать рост бактерий. В связи с этим целесообразнее использовать регули-

емые сильные промоторы, включить которые для синтеза чужеродного белка можно и в том случае, когда получена большая бактериальная масса. В частности, к числу регулируемых сильных промоторов следует отнести термочувствительный промотор *pL*, который ответствен за экспрессию нескольких генов бактериофага. Белок-репрессор, блокирующий данный промотор, активен при 31 °С, но неактивен при 38 °С, следовательно, при инкубировании бактерий при 31 °С чужеродный ген не экспрессируется и, наоборот, повышение температуры вызывает инактивацию репрессора и высокий уровень синтеза нужного белка.

Последовательность оснований длиной 6 — 8 нуклеотидов, расположенная непосредственно перед иницирующим кодоном АУГ у *E. coli*, определяет эффективность процесса трансляции. Эта последовательность представляет собой участок связывания мРНК с рибосомой, и его сдвиг в ту или иную сторону способен уменьшать эффективность трансляции мРНК. По имени исследователей, идентифицировавших этот участок, он был назван *последовательностью Шайн — Дальгарно*. Обычно эту последовательность включают в состав самого вектора вместе с иницирующим кодоном на нужном расстоянии. При экспрессии векторов такого типа образуется гибридный белок, в котором несколько N-концевых аминокислотных остатков происходят от источника регуляторных элементов и иницирующего кодона прокариотического гена. Такие гибридные белки часто более стабильны; обработка их химическим или ферментативным способом приводит к выделению эукариотической части белка.

Суммарная активность экспрессируемого гена возрастает с ростом числа копий рекомбинантной ДНК в расчете на клетку. Используя многокопийные плазмиды, можно получить сверхсинтез нужных белковых продуктов. Получены температурно-чувствительные мутантные плазмиды, способные накопить до 1 — 2 тыс. копий на клетку без нарушения жизненно важных функций бактерий. Обычно же используемые плазмидные векторы поддерживаются в клетке в количестве 20 — 50 копий. Получение бактериальных штаммов-сверхпродуцентов плазмидных генов — одна из важнейших задач современной биотехнологии в экономическом, медицинском и социальном аспектах.

## **5.5. КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ В РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНИЗМАХ**

В настоящее время разработаны системы клонирования в бактериях, дрожжах, грибах, растениях и млекопитающих. Особый интерес с экономической точки зрения представляют системы

клонирования генов в грамположительных бактериях, многие из которых являются сверхпродуцентами важнейших химических соединений. Значительных успехов в биоиндустрии удалось достичь с клетками *Bacillus subtilis*, стрептомицетами и *Saccharomyces cerevisiae*.

Векторы для клонирования в таких системах представляют собой *двойные репликоны*, способные существовать и в *E. coli*, и в той клетке хозяина, для которой они предназначены. С этой целью создают гибридные векторы, содержащие репликон какой-либо из плазмид *E. coli* и требуемый репликон (из бактерий, дрожжей и др.), и первоначально клонируют с последующим отбором требуемых генов в хорошо изученной системе. Затем выделенные рекомбинантные плазмиды вводят в новый организм. Такие векторы должны содержать ген (или гены), придающий клетке-хозяину легко тестируемый признак.

*B. subtilis* — непатогенный почвенный микроорганизм. Клеточная стенка бактерии имеет простую структуру, позволяющую секретировать многие белки в культуральную жидкость. В частности, 20 различных видов бактерий синтезируют более 40 ферментов с внеклеточной локализацией. В этих бациллах обнаружены плазмиды и фаги, генетика которых хорошо изучена. Клонирование осуществляется с помощью так называемых *челночных векторов*, которые способны реплицироваться в клетках нескольких хозяев: *B. subtilis*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*. Векторы были получены комбинацией *in vitro* фрагментов плазмид *St. aureus*, *E. coli* и хромосомных фрагментов *B. subtilis*. Полученные рекомбинантные штаммы несут признаки устойчивости к антибиотикам.

Стрептомицеты широко применяют в биотехнологии в качестве продуцентов антибиотиков. Конструирование векторов для клонирования в них началось с выделения плазмиды *Scp2* из *Streptomyces coelicolor*. На основе этой плазмиды были сконструированы векторы, придающие стрептомицетам устойчивость к антибиотикам, например к метиленомицину А.

**Клонирование в дрожжах.** Среди дрожжей наиболее полно изучен вид *S. cerevisiae*. У этого вида в гаплоидных клетках содержится 17 хромосом, в их составе идентифицировано несколько сотен генов. Большинство штаммов дрожжей содержат автономно реплицирующуюся кольцевую ДНК длиной 2 мкм. Плазмида *Scp1* *S. cerevisiae* содержит около 6300 пар оснований и имеет 50—100 копий на клетку. Ее гибриды с плазмидами обычно и используют в качестве векторов. Работа с дрожжами облегчается тем, что подобно бактериям они могут расти в жидкой среде и давать колонии на твердой среде, а также имеют сравнительно короткое время регенерации (несколько часов) вследствие малого размера генома.



Процедура выделения ДНК в клетки дрожжей довольно проста. Обычно целлюлозную клеточную стенку удаляют обработкой ферментами, получая так называемые сферопласты. Их инкубируют с ДНК в присутствии  $\text{CaCl}_2$  и полиэтиленгликоля. Мембрана при этом становится проницаемой для ДНК. Дальнейшая инкубация сферопластов в среде с агаром восстанавливает клеточную стенку. Селекция дрожжевых клонов, трансформированных рекомбинантными плазмидами, основана на применении в качестве клеток-хозяев определенных мутантов, не способных расти на среде, в которой отсутствует тот или иной питательный компонент. Векторная плазмида содержит гены, которые при попадании в клетку-хозяина придают ей этот недостающий признак. Трансформанты легко отбираются по их способности давать колонии на обедненной среде. Применяя приемы, аналогичные использовавшимся при клонировании в бактериях, удастся достичь синтеза чужеродных белков в дрожжевых клетках. Эти клетки подобно *B. subtilis* секретируют большое количество белка во внеклеточную среду, что используется также для секреции чужеродных белков, например интерферона человека.

**Клонирование в клетках животных.** Проблема введения генов в клетки млекопитающих очень важна для исследования функционирования генов высших эукариот.

Предварительно клонированные гены вводят в клетку животных различными путями. Суть одного из них состоит в трансформации клеток требуемым геном, соединенным с одним из генов, для которых осуществляется селекция. Для идентификации и последующего размножения клеток, содержащих интегрированную ДНК, был разработан метод, получивший название метода маркера. Примером может служить метод получения клеток, дефектных по синтезу фермента тимидинкиназы ( $\text{TK}^-$ -клетки). Такие клетки трансформировались фрагментами ДНК вируса герпеса (HSV), содержащего ген фермента ТК, и после трансформации они приобретали способность к синтезу фермента на селективной среде, т.е. становились  $\text{TK}^+$ -клетками. Клетки  $\text{TK}^+$  легко отличаются от клеток  $\text{TK}^-$ , поскольку способны расти на средах с аминоптеринем (ингибитор, блокирующий определенные стадии биосинтеза нуклеотидов), гипоксантином и тимидином. Следовательно, в данном случае для трансформации клеток животных были использованы гибриды бактериальных плазмид с геном ТК из вируса герпеса. Для этого предварительно проводили клонирование и идентификацию генов в клетках *E. coli* и затем полученная рекомбинантная плазмида вводилась в  $\text{TK}^-$ -клетки. Анализ методом блот-гибридизации подтвердил, что выжившие клетки содержали интегрированный в геном ТК-ген вируса герпеса.



Селективные маркеры дают возможность вводить в клетки млекопитающих любой ген, заранее лигированный с клонированным селективным маркером.

В последние годы сконструировано большое количество так называемых челночных векторов и их рекомбинантных производных, способных к репликации в животной и бактериальной клетках, экспрессирующие клонируемый ген в животной клетке. К числу таких векторов можно отнести векторы из плазмиды pBR322 и интактного района транскрипции ДНК SW-40. Геном SW-40 представляет собой циклическую ДНК длиной 5243 п.о. Однако в вирусах животных размеры несущественных областей малы и в них нельзя внедрить большие фрагменты чужеродной ДНК, например ген дигидрофолатредуктазы мыши размером 42 kb. В большинстве случаев чужеродная ДНК замещает существенные гены, в результате чего рекомбинантные вирусы утрачивают способность к репликации. Для ее функционирования используют «вирусы-помощники», синтезирующие продукты недостающих генов, за счет которых и существует рекомбинантный вирус. Обычно опухолевые вирусы (в том числе SV-40) внедряют свою ДНК в хромосому клетки-хозяина и тем самым убивают ее при своем размножении. Обычно вирус бычьей папилломы в трансформированных клетках существует в виде эписомы ( $\approx 100$  копий на клетку) и используется в качестве основы для конструирования эписомных векторов. Одна из важнейших задач генетической инженерии — разработка технологий по созданию векторов, подобных плазмидам, не убивающим клетку-хозяина и эффективно экспрессирующим клонируемый ген в животной клетке.

Представляют немаловажный интерес *микроинъекции* ДНК непосредственно в ядро клетки. Так, плазмиды, содержащие фрагмент вируса герпеса с геном тимидинкиназы, и плазмиды pBR322 были инъецированы в ТК<sup>-</sup>-клетки, при этом ТК-ген проник в ядра и нормально в них реплицировался.

Трансформация соматических клеток млекопитающих открывает возможность для изучения механизмов регуляции экспрессии генов и целенаправленно модифицировать генетический аппарат клетки животных, в том числе и человека. Культуры клеток млекопитающих могут быть эффективным источником выделения ряда вирусных антигенов с целью получения вакцин для животных и человека.

В настоящее время разработаны способы введения генов в эмбриональные клетки млекопитающих, мух и некоторых растений с целью изменения свойств организма, таких, как скорость роста, устойчивость к заболеваниям и внешним воздействиям. Подобного рода работы были начаты с довольно крупными яйцами амфибий, а затем продолжены с яйцеклетками и эмбрионами

мышь. Микроинъекцию клонированных генов проводят в один или оба пронуклеуса только что оплодотворенной яйцеклетки мыши. После инъекции яйцеклетку немедленно имплантируют в яйцевод приемной матери или дают возможность развиваться в культуре до стадии бластоцисты, после чего имплантируют в матку. Таким образом были инъецированы гены интерферона и инсулина человека, ген глобина кролика, ген тимидинкиназного вируса герпеса и кДНК вируса лейкемии мышей. Выживает обычно от 10 до 30 % яйцеклеток, а доля мышей, родившихся из трансформированных яйцеклеток, составляет от нескольких до 40 %.

Выяснено, что уровень экспрессии чужеродного гена зависит от места интеграции ДНК с хромосомами, от дифференцировки тканей.

Несмотря на определенные успехи в области интеграции чужеродных генов в эмбриональные клетки животных, до сих пор не удалось встроить чужеродную ДНК в заданный участок хромосомы, вытеснить ген и заменить его новой нуклеотидной последовательностью, подчинить новый ген системе регуляции организма. Преодоление этих трудностей позволит успешно осуществлять генотерапию человека — лечение нескольких десятков генетических заболеваний, обусловленных отсутствием или дефектами генов.

## 5.6. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ

Применение методов генетической инженерии в животноводстве открывает перспективу изменения ряда свойств организма: повышение продуктивности, резистентности к заболеваниям, увеличение скорости роста, улучшение качества продукции и др. Животных, несущих в своем геноме рекомбинантный (чужеродный) ген, принято называть *трансгенными*, а ген, интегрированный в геном реципиента, — *трансгеном*. Продукт этого гена (белок) является трансгенным. Благодаря переносу генов у трансгенных животных возникают новые качества, а дальнейшая селекция позволяет закрепить их в потомстве и создавать трансгенные линии.

Получение трансгенных животных предусматривает ряд этапов: приготовление раствора ДНК для микроинъекции; извлечение эмбрионов из донорных организмов; микроинъекция ДНК и пересадка инъецированных эмбрионов в яйцеводы или после культивирования в матку синхронизированных реципиентов. У родившихся потомков исследуют экспрессию трансгена на уровне транскрипции и трансляции. Трансгенное потомство получают путем использования традиционных методов разведения животных. Следует отметить, что от приготовления инъекционного раствора ДНК (его чистоты, концентрации) во многом зависит

эффективность получения трансгенных животных. Обычно гены транспортируют на ранних стадиях развития животного (в большинстве случаев на стадии зиготы и двухклеточных эмбрионов). Для трансформации генов в геном животного используют следующие приемы: микроинъекцию ДНК в пронуклеус зигот или в каждый бластомер у двухклеточного эмбриона; введение ДНК с помощью ретровирусных векторов; получение трансгенных химер из генетически трансформированных клеток и эмбрионов. В настоящее время наиболее распространенный метод — микроинъекция ДНК. Ее осуществляют с помощью специальной пипетки (внутренний диаметр ее около 1 мкм), а количество инъецированного раствора ДНК составляет 1—2 пкл. После инъекции ДНК эмбрионы культивируют до момента пересадки реципиентам. Следует отметить, что микроинъекция эмбрионов сельскохозяйственных животных значительно сложнее, чем микроинъекция эмбрионов мышей и кроликов.

После небольшого культивирования *in vitro* проинъецированные эмбрионы переносят в яйцеводы (хирургическим путем) реципиентов. Каждому реципиенту мыши, кролика и свиньи обычно пересаживают 20—30 инъецированных зигот, причем у свиней все эмбрионы трансплантируют в один яйцевод; у мышей и кроликов — отдельно по яйцеводам, а у овец, коз и крупного рогатого скота — по 2—4 эмбриона каждому реципиенту. Используя методы блот-анализа, дот-блот-анализа и полимеразную цепную реакцию (ПЦР), можно получить вполне надежные доказательства интеграции и экспрессии ДНК у трансгенных животных. С этой целью используют ядросодержащие клетки тканей или внутренних жидкостей реципиента, из которых выделяют ДНК.

Для исследования у трансгенных животных выделяют РНК из тех тканей, в которых предполагается наиболее высокий уровень экспрессии. Качественный и количественный анализы экзогенных белков позволяют судить об уровне трансляции инъецированного генного материала.

Генетический анализ родившихся трансгенных животных и полученного от них потомства показал, что, несмотря на инъекцию ДНК на ранних стадиях, в трансгенных линиях могут появляться так называемые *мозаики*. К мозаикам относят животных, происходящих из одной зиготы, но имеющих разные генотипы. Помимо клеточных линий, содержащих трансген, они имеют еще и нетрансгенные клеточные линии. Подсчитано, что около 30 % первичных трансгенных животных, полученных методом микроинъекции ДНК, — мозаики, что затрудняет создание чистых *трансгенных линий* животных. Этим объясняется тот факт, что трансген не передается потомству с ожидаемой в соответствии с законами Менделя частотой 50 %. Часть мозаиков вообще не мо-

жет дать начало трансгенным линиям, так как у них отсутствует передача трансгена по наследству.

Одна из важнейших задач сельскохозяйственной биотехнологии — выведение трансгенных животных с улучшенной продуктивностью и более высоким качеством продукции, резистентностью к болезням, а также создание так называемых *животных-биореакторов* — продуцентов ценных биологически активных веществ. Каковы же успехи биотехнологии в этом направлении? С генетической точки зрения особый интерес представляют гены, кодирующие белки каскада гормона роста: непосредственно гормон роста (ГР), рилизинг-фактор (РФ) и инсулинподобный фактор (ИФ) гормона роста.

В конце 70-х годов XX в. на основе технологии рекомбинантной ДНК получили гормон роста микробного происхождения. Было показано, что этот ГР оказывает такое же стимулирующее действие на лактацию и рост животного, как и гипофизарный ГР. Гормон роста, полученный с помощью методов генетической инженерии, при крупномасштабном применении вызывал увеличение удоев на 23 — 31 % при дозе 13 мг в день. Разработаны формы препарата пролонгированного действия, позволяющие использовать его один раз в две недели и даже в месяц. При ежедневной инъекции ГР молодняку крупного рогатого скота, свиней и овец удалось увеличить суточные привесы на 20 — 30 % при значительном сокращении расхода кормов на единицу прироста. У молодняка свиней с ускорением роста увеличивалось содержание белка и уменьшалось содержание жира в тканях, что повышало качество мясопродуктов.

Первые трансгенные мыши с геном ГР были получены в 1982 г. У них отмечалось повышение скорости роста и увеличение конечной живой массы.

По данным Л. К. Эрнста (1996), у трансгенных свиней с геном рилизинг-фактора гормона роста (РФ ГР) конечная живая масса была на 15,7 % выше по сравнению с контрольными животными. У потомства трансгенных свиней, получавших модифицированный кормовой рацион с повышенным содержанием белка (18 % сырого протеина) и с дополнительным количеством лизина, отмечались более высокие среднесуточные привесы (на 16,5 %).

У трансгенных овец с генами ГР и РФ ГР, несмотря на повышенный уровень ГР, скорость роста не увеличивалась. Вместе с тем, по данным большинства исследователей, у трансгенных свиней наряду с повышением содержания белка наблюдалось двукратное уменьшение толщины шпика (7 — 8 мм у трансгенных против 18 — 20 мм у контрольных животных); аналогичные показатели отмечены у трансгенных овец (25 — 30 % жира у контрольных животных против 5 — 7% у трансгенных овец).

Рассматривается возможность уменьшения лактозы в молоке путем создания животных, у которых присутствует специфический для молочной железы промотор, соединенный с геном фермента  $\beta$ -галактозидазы, катализирующей распад лактозы. Молоко таких животных, не содержащее лактозы, могут использовать люди, у которых не синтезируется  $\beta$ -галактозидаза. Ведутся работы по введению генных конструкций в организм трансгенных животных, вырабатывающих антитела, предотвращающие маститы.

Другая важная задача — выведение *трансгенных животных, устойчивых к заболеваниям*. Потери в животноводстве, вызванные различными болезнями, достаточно велики, поэтому все более важное значение приобретает селекция животных по резистентности к болезням, вызываемых микроорганизмами, вирусами, паразитами и токсинами. Пока результаты селекции на устойчивость животных к различным заболеваниям невелики, но обнадеживающи. В частности, созданы популяции крупного рогатого скота с примесью крови зебу, устойчивые к некоторым кровепаразитарным заболеваниям. Установлено, что защитные механизмы от инфекционных заболеваний обусловлены либо препятствием вторжению возбудителя, либо изменением рецепторов. Вторжению возбудителей, равно как и их размножению, препятствуют в основном иммунная система организма и экспрессия генов главного комплекса гистосовместимости. Одним из примеров гена резистентности у мышей служит ген *Mx*. Этот ген, обнаруженный в модифицированной форме у всех видов млекопитающих, вырабатывает у *Mx*<sup>+</sup>-мышей иммунитет к вирусу гриппа А. Ген *Mx*<sup>+</sup> был выделен, клонирован и использован для получения трансгенных свиней, экспрессирующих ген *Mx* на уровне РНК. Однако данные о трансляции *Mx*-протеина, обуславливающего устойчивость трансгенных свиней к вирусу гриппа А, пока не получены. Ведутся исследования в целях получения трансгенных животных, резистентных к маститу за счет повышения содержания белка лактоферина в тканях молочной железы. На культуре клеток из почек трансгенных кроликов было показано, что клеточные линии, содержащие трансгенную антисмысловую РНК, имели резистентность против аденовируса H5 (Ad<sub>5</sub>) более высокую на 90 — 98 % по сравнению с контрольными линиями клеток. Л. К. Эрнст продемонстрировал также устойчивость трансгенных животных с геном антисмысловой РНК к лейкозу крупного рогатого скота, к заражению вирусом лейкоза.

Показана возможность конструирования системы внутриклеточной иммунизации против инфекционных вирусов с участием мутационных форм эндогенных вирусных белков, защищающих от соответствующих вирусов. Так, получены трансгенные куры, устойчивые к лейкозу, у которых в клетках присутствовал белок вирусной оболочки.

Одна из важнейших задач стратегии использования трансгенных животных в медицине — получение *биологически активных соединений* за счет включения в клетки организма генов, вызывающих у них синтез новых белков.

Трансгенные животные как продуценты ценных биологически активных белков и гормонов имеют ряд преимуществ перед микроорганизмами и клеточными системами. Важно, что новые белки, получаемые в линиях клеток трансгенных животных, могут быть модифицированы, их активность сравнима с активностью протеинов. Для молочного производства представляет большой интерес получение целенаправленной трансгенной экспрессии в эпителиальные клетки молочной железы с целью выхода белков с молоком. Один из основных этапов получения трансгенных животных, продуцирующих гетерогенный белок с молоком, — идентификация промотора, направляющего экспрессию структурных генов в секреторный эпителий молочной железы.

В настоящее время выделены гены и промоторы  $\alpha$ S1-казеина,  $\beta$ -казеина,  $\alpha$ -лактоальбумина,  $\beta$ -лактоглобулина и сывороточного кислого протеина (WAP). Молочная железа — великолепный продуцент чужеродных белков, которые можно получать из молока и использовать в фармацевтической промышленности. Из молока трансгенных животных извлекают следующие рекомбинантные белки: человеческий белок С, антигемофильный фактор IX,  $\alpha$ -1-антитрипсин, тканевой плазменный активатор, лактоферин, сывороточный альбумин, интерлейкин-2, урокиназу и химозин. В большинстве проектов, за исключением  $\alpha$ -1-антитрипсина и химозина, эти исследования пока еще на стадии разработки и ведутся в основном на трансгенных мышах, поэтому оценивать их с точки зрения коммерческого интереса еще рано.

Вышесказанное можно проиллюстрировать следующими примерами. В США осуществлен метод микроинъекции ДНК, отвечающий за экспрессию  $\beta$ -лактоглобулина, который способен продуцироваться только в молочных железах животных. В Эдинбурге в 1992 г. были выведены трансгенные овцы с геном  $\alpha$ -1-антитрипсина человека и  $\beta$ -глобулиновым промотором. Содержание этого белка у разных трансгенных овец составляло от 1 до 35 г/л, что соответствует половине всех белков в молоке. При таком уровне продукции белка может быть получено около 10 кг трансгенного белка от одного животного в год, что достаточно для 50 пациентов при лечении эмфиземы легких. Обычно выход рекомбинантных белков в системах с использованием культуры клеток составляет около 200 мг/л, а у трансгенных животных он может повышаться до 1 л. Следует заметить, что создание клеточных культур и их выращивание в промышленных реакторах, а также выведение трансгенных животных и их обслуживание — дорогие и



сложные процедуры. Однако трансгенные животные легко размножаются, содержание их сравнительно дешево, что делает этих животных хорошими продуцентами разнообразных белков с низкой стоимостью. В России группой ученых под руководством Л. К. Эрнста получены трансгенные овцы с геном химозина, в 1 л молока которых содержится 200 — 300 мг химозина — основного компонента для производства сыра. Стоимость его будет в несколько раз ниже продукта, получаемого традиционным способом из сычугов молочных телят и ягнят. Приведены данные, свидетельствующие о высокой эффективности производства сыра с использованием химозина молока трансгенных овец. Так, из 3 л молока трансгенной овцы можно получить достаточное количество химозина для производства 1 т сыра из коровьего молока.

## **5.7. ПОЛУЧЕНИЕ ИНСУЛИНА НА ОСНОВЕ МЕТОДОВ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ**

Инсулин — гормон поджелудочной железы, регулирующий углеводный обмен и поддерживающий нормальный уровень сахара в крови. Недостаток этого гормона в организме приводит к одному из тяжелейших заболеваний — сахарному диабету, который как причина смерти стоит на третьем месте после сердечно-сосудистых заболеваний и рака. Инсулин — небольшой глобулярный белок, содержащий 51 аминокислотный остаток и состоящий из двух полипептидных цепей, связанных между собой двумя дисульфидными мостиками. Синтезируется он в виде одноцепочечного предшественника — препроинсулина, содержащего концевой сигнальный пептид (23 аминокислотных остатка) и 35-звенный соединительный пептид (С-пептид). При удалении сигнального пептида в клетке образуется проинсулин из 86 аминокислотных остатков, в котором А и В-цепи инсулина соединены С-пептидом, обеспечивающим им необходимую ориентацию при замыкании дисульфидных связей. После протеолитического отщепления С-пептида образуется инсулин.

Известно несколько форм сахарного диабета. Самая тяжелая форма, для лечения которой больному необходим инсулин (инсулинзависимая форма заболевания), вызвана избирательной гибелью клеток, синтезирующих этот гормон (клетки островков Лангерганса в поджелудочной железе). Форма сахарного диабета, для лечения которой инсулин не требуется, распространена чаще, с ней удается справиться с помощью соответствующих диет и режима. Обычно поджелудочная железа крупного рогатого скота и свиней не используется в мясной и консервной промышленности и поставля-



ется в вагонах-рефрижераторах на фармацевтические предприятия, где проводят экстракцию гормона. Для получения 100 г кристаллического инсулина необходимо 800 — 1 000 кг исходного сырья.

Синтез обеих цепей и соединение их дисульфидными связями для получения инсулина были проведены в 1963 и 1965 гг. тремя коллективами исследователей в США, Китае и ФРГ. В 1980 г. датская компания «Ново индастри» разработала метод превращения инсулина свиньи в инсулин человека путем замещения 30-го остатка аланина в цепи В на остаток треонина. Оба инсулина не различались по активности и времени действия.

Работы по генно-инженерному получению инсулина начались около 20 лет назад. В 1978 г. появилось сообщение о получении штамма кишечной палочки, продуцирующего крысиный проинсулин (США). В этом же году были синтезированы отдельные цепи человеческого инсулина посредством экспрессии их синтетических генов в клетках *E. coli* (рис. 5.11). Каждый из полученных синтетических генов подстраивался к 3'-концу гена фермента  $\beta$ -галактозидазы и вводился в векторную плазмиду (pBR322). Клетки *E. coli*, трансформированные такими рекомбинантными плазмидами, производили гибридные (химерные) белки, состоящие из фрагмента  $\beta$ -галактозидазы и А или В пептида инсулина, присоединенного к ней через остаток метионина. При обработке химерного белка бромцианом пептид освобождается. Однако замыкание дисульфидных мостиков между образованными цепями инсулина происходило с трудом.

В 1981 г. синтезирован ген-аналог проинсулина — мини-С-проинсулин, в котором 35-звенный С-пептид был заменен на сегмент из шести аминокислот: арг-арг-гли-сер-лиз-арг и показана его экспрессия в *E. coli*.

В 1980 г. У.Гилберт с сотрудниками выделили мРНК инсулина из опухоли  $\beta$ -клеток поджелудочной железы крысы и с помощью обратной транскриптазы получили с нее кДНК. Полученную кДНК встроили в плазмиду pBR322 *E. coli*, в среднюю часть гена пенициллиназы. Рекомбинантная плазида содержала информацию о структуре проинсулина. В результате трансляции мРНК в клетках синтезировался гибридный белок, содержащий последовательности пенициллиназы и проинсулина, который выщепляли из такого белка трипсином.

В 1978 г. сотрудниками Института биоорганической химии под руководством академика Ю. А. Овчинникова был осуществлен синтез двух структурных генов, кодирующих синтез нейропептидов: *лейцин-энкефалина* и *брадикинина*. Синтезированный ген лейцин-энкефалина имел два «липких» конца:



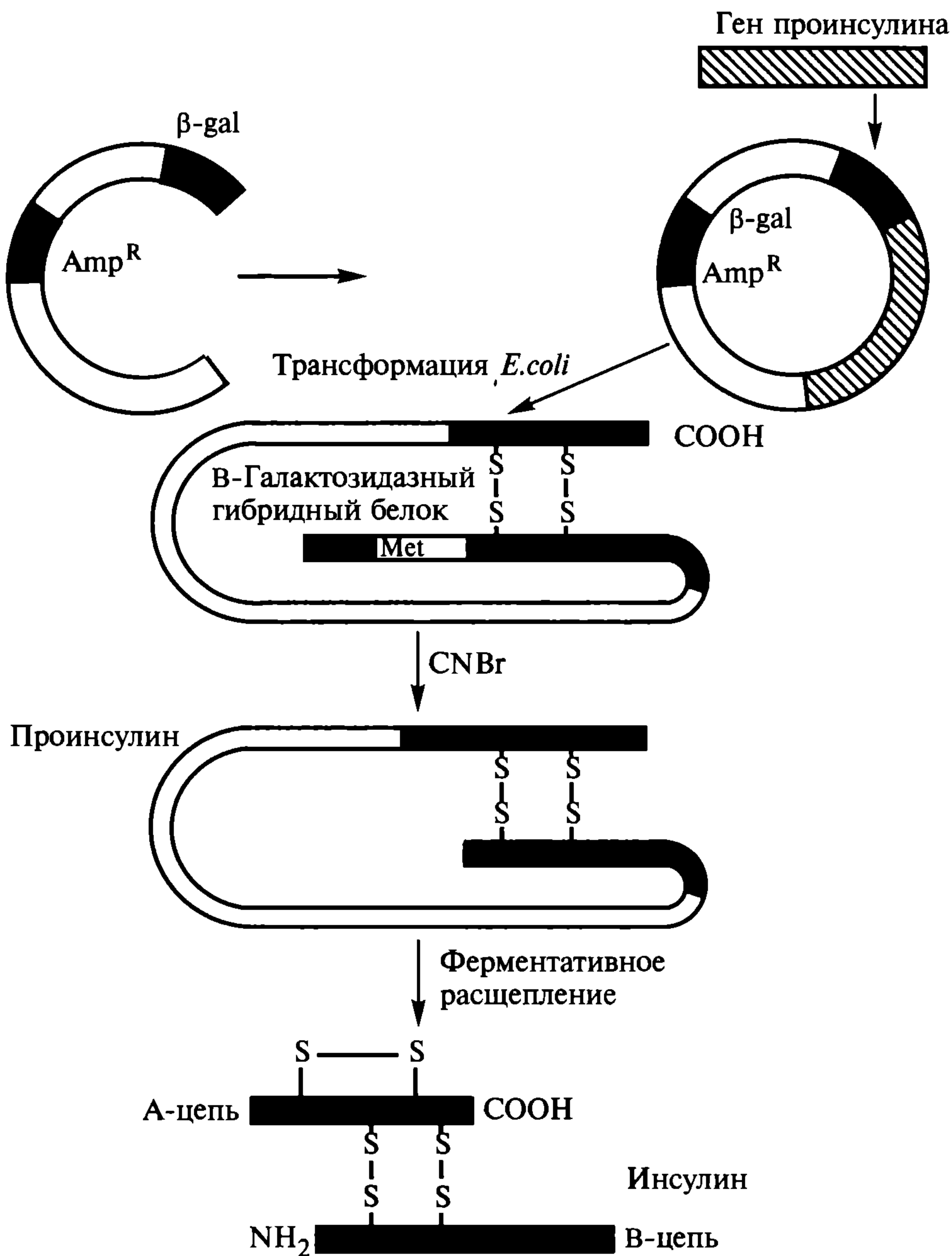


Рис. 5.11. Схема синтеза инсулина

Полученный синтетический ген был встроен вместе с фрагментом природной ДНК, содержащим промотор и проксимальную часть гена белка  $\beta$ -галактозидазы кишечной палочки *E. coli*, в плазмиду-вектор pBR322 и обработан смесью рестриктаз — EcoRI и BamHI. Полученная рекомбинантная плазмида *pEκ* была трансформирована в клетки *E. coli*. В результате экспрессии встроенного гена бактерия начала продуцировать гибридный (химерный) белок, содержащий на N-конце участок  $\beta$ -галактозидазы, а на C-конце — последовательность нейропептида. С помощью бромциана химерный белок расщепляли *in vitro* и получали активный **лейцин-энкефалин**. На рис. 5.12 представлены схема клонирования

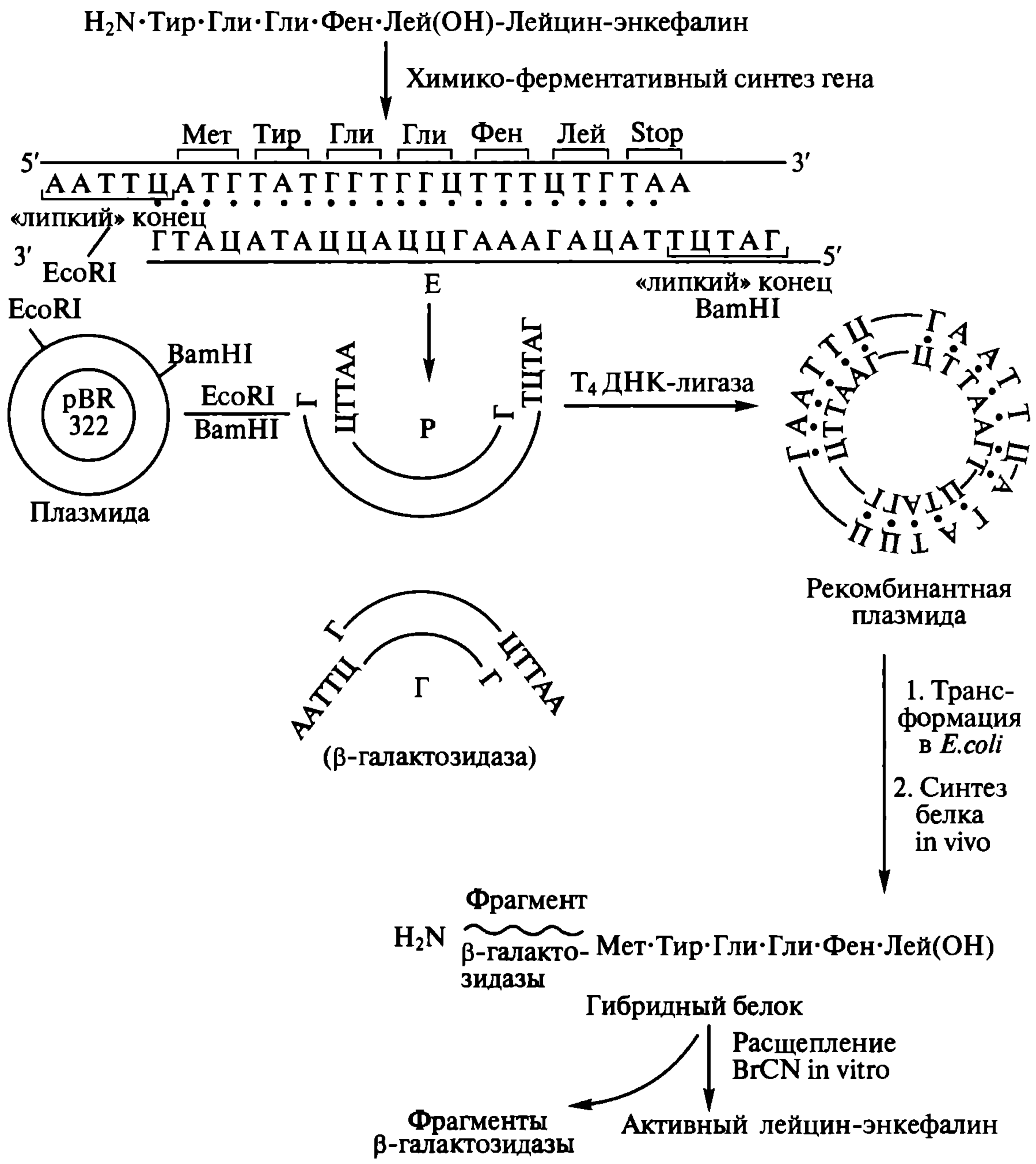


Рис. 5.12. Схема синтеза гибридного и активного лейцин-энкефалина синтетического гена лейцин-энкефалина и его экспрессия в клетках кишечной палочки.

Аналогичным путем был синтезирован *соматостатин* — гормон гипоталамуса (рис. 5.13). Молекула соматостатина состоит из 14 аминокислотных остатков. Соматостатин подавляет выделение инсулина и гормона роста человека. В Национальном медицинском центре «Хоуп» (Калифорния) был осуществлен химико-ферментативный синтез гена длиной в 42 нуклеотида, способного кодировать соматостатин. Участок ДНК, кодирующий гормон соматостатин, получен путем соединения тринуклеотидов. Из 52 п. н.

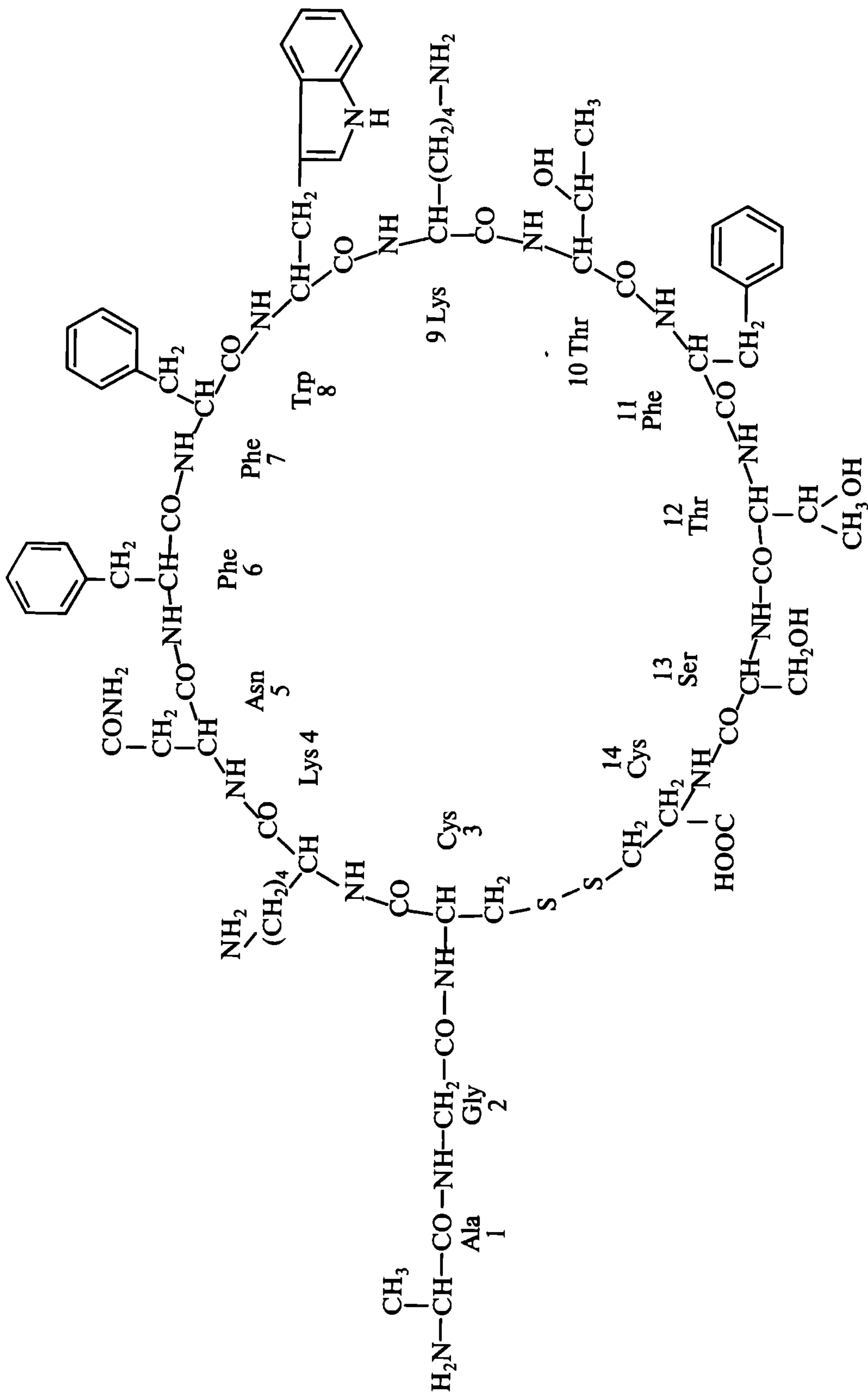


Рис. 5.13. Первичная структура молекулы соматостатина

синтетического гена 42 пары составляли структурный ген гормона, а остальные служили для присоединения синтетического гена к плазмиде pBR322, а также к сегменту лактозного оперона (lac) из генома *E. coli* или к  $\beta$ -галактозидазному гену. Такую синтетическую чужеродную ДНК встраивали непосредственно за бактериальным геномом (или внутри его) после расщепления ДНК рестрикционными эндонуклеазами с образованием в результате трансляции гибридного белка.

Основные этапы генно-инженерного синтеза соматостатина показаны на рис. 5.14. Синтетический ген соматостатина был

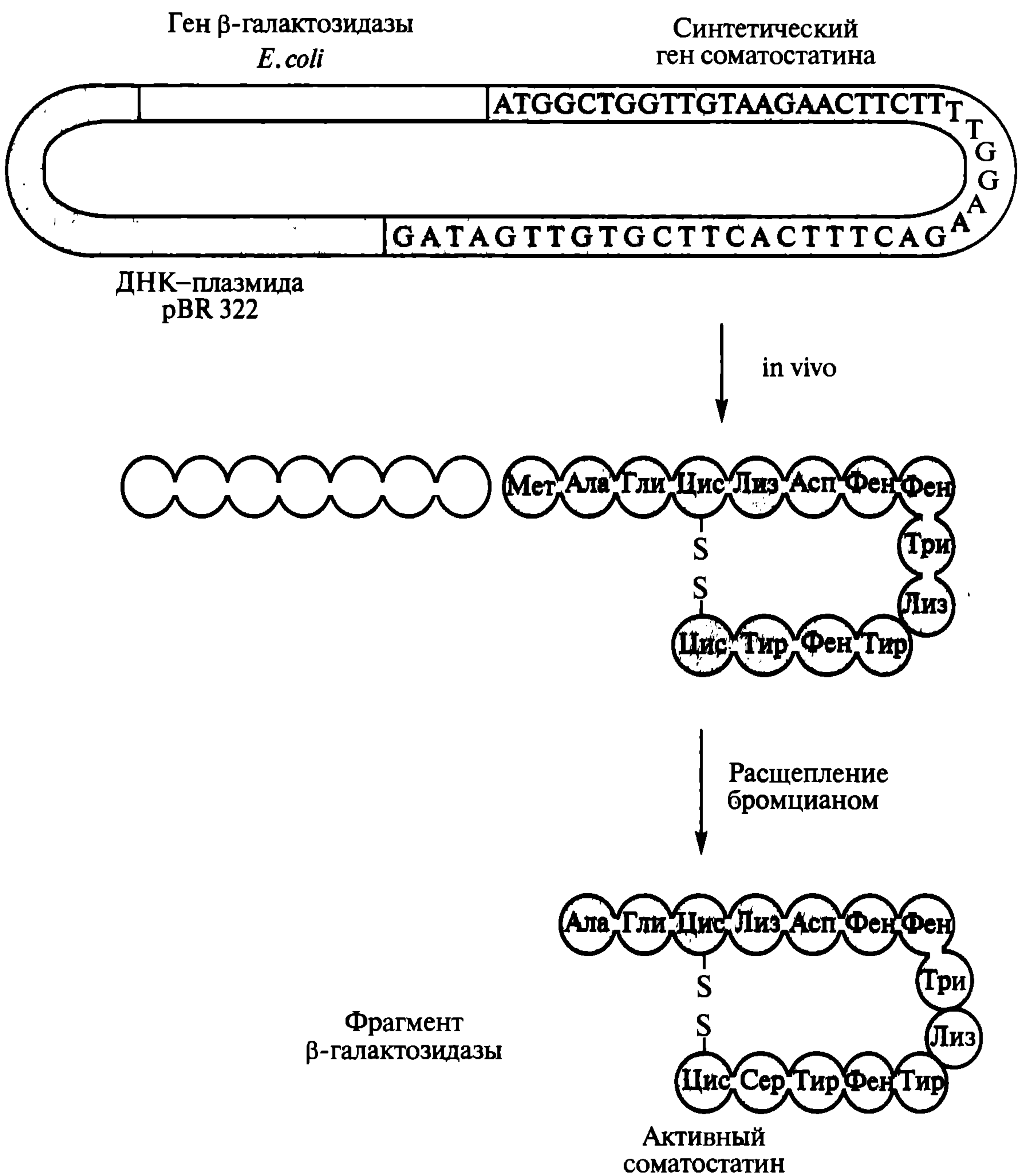


Рис. 5.14. Схема синтеза соматостатина в бактериальной системе

встроен в плазмиду pBR322 *E. coli* вблизи конца гена, кодирующего фермент  $\beta$ -галактозидазу. Между двумя генами был помещен кодон метионина. После выделения рекомбинантной плазмиды в бактериальную клетку кишечная палочка стала синтезировать гибридный белок. Часть его (соматостатин) затем отщепляли от  $\beta$ -галактозидазы BrCN. Такой сложный способ получения гормона был необходим, поскольку соматостатин, синтезированный в виде свободных молекул, быстро деградирует под действием бактериальных протеаз. Первый синтез соматостатина генно-инженерным способом был осуществлен в 1977 г. А. Бойером. Выход гормона составил 10 000 молекул на одну клетку. Из 100 г биомассы *E. coli*, выращенной в ферментере объемом 8 л, удалось выделить 5 мг соматостатина, т.е. столько, сколько можно его выделить из 100 г овечьих мозгов.

## 5.8. СИНТЕЗ СОМАТОТРОПИНА

Соматотропин (или гормон роста человека ГРЧ) секретируется передней долей гипофиза. Впервые он был выделен и очищен в 1963 г. из гипофиза. Его недостаток приводит к заболеванию — гипофизарной карликовости (1 случай на 5 000 человек). Гормон обладает видовой специфичностью. Обычно его получают из гипофиза трупов, но в недостаточном количестве. Гормона хватает лишь для лечения 1/3 случаев гипофизарной карликовости в развитых странах. Основные производители — Швеция, Италия, Швейцария и США. Молекула ГРЧ состоит из 191 аминокислотного остатка.

Препарат из трупного материала представляет собой смесь из нескольких форм, из которых пять имеют 22 кДа, другие являются димерами, а остальные — фрагментами, образующимися при протеолизе. Это приводило к тому, что у 30 % больных, получавших препарат, против гормона вырабатывались антитела, сводившие на нет его биологическую активность.

Принимая во внимание это обстоятельство, в настоящее время ГРЧ синтезируют методами генетической инженерии в специально сконструированных клетках бактерий. Будучи синтезированным в клетках *E. coli*, ГРЧ содержит дополнительный остаток метионина на  $H_2N$ -конце молекулы. Биосинтез ГРЧ из 191 аминокислотного остатка был осуществлен в 1979 г. Д. Гедделем с сотрудниками. Сначала клонировали двунитевую кДНК; далее путем расщепления получали последовательность, кодирующую аминокислотный порядок гормона, за исключением первых 23 аминокислот — от фен ( $-NH_2$ ) до лей (23), и синтетический полинуклеотид, соответствующий аминокислотам от первой до

двадцать третьей со стартовым ATG-кодоном в начале. Затем два фрагмента объединяли и подстраивали к паре lac-промоторов и участку связывания рибосом. Конечный выход гормона составил 2,4 мкг на 1 мл культуры, что составляет 100 000 молекул гормона на клетку. Полученный гормон на конце полипептидной цепи содержал дополнительный остаток метионина и обладал значительной биологической активностью. С 1984 г. после серьезных клинических испытаний на токсичность компанией «Генетек» (Сан-Франциско) было начато широкомасштабное производство бактериального соматотропина.

ГРЧ в клетках *E. coli* и в культуре клеток животных был получен в 1982 г. одновременно в Институте Пастера (Париж) и Институте молекулярной биологии (Москва). Оказалось, что в бактериальных клетках возможен синтез аналогов ГРЧ, с помощью которых изучались участки молекулы, важные для стимулирования роста и процесса неоглюкогенеза на молекулярном уровне.

Огромный интерес представляют выделение и синтез полипептида, обладающего полной биологической активностью *гипоталамического релизинг-фактора соматотропина* (СТГ-РФ). Введение этого фактора способно компенсировать недостаток соматотропина. Таким образом, наличие СТГ-РФ и самого гормона, полученных в генетически сконструированных бактериальных клетках, очень важно для успешного лечения заболеваний, обусловленных недостатком этого гормона, и ряда патологических заболеваний, таких, как некоторые формы диабета, регенерация тканей после ожогов и др. Предполагаем, что СТГ-РФ можно использовать и для увеличения массы и роста домашних животных, так как он, не обладая видовой специфичностью, способен стимулировать освобождение гормона роста у ряда животных.

***β-Эндорфин*** — опиат мозга, состоящий из 31 аминокислотного остатка, был синтезирован в генетически сконструированных клетках в 1980 г. группой ученых из Австралии и США. *β-Эндорфин* получен в клетках *E. coli* в виде гибридного белка с *β*-галактозидазой. Процедура синтеза *β*-эндорфина включала получение путем обратной транскрипции мРНК — кДНК, кодирующей белок-предшественник, содержащий помимо последовательности *β*-эндорфина последовательность АКТГ и *β*-липотропина (*β*-ЛТГ), в дальнейшем удаляемые. *β*-Эндорфин, полученный из гибридного белка и тщательно очищенный, обладал значительной биологической активностью. Он специфически взаимодействовал с антисывороткой против *β*-эндорфина. От *β*-эндорфина человека генно-инженерный *β*-эндорфин отличался по двум аминокислотам, и эти отличия можно было легко устранить на нуклеотидном уровне путем замены двух кодонов в ДНК бактериальной плазмиды.



## 5.9. ПОЛУЧЕНИЕ ИНТЕРФЕРОНОВ

Интерфероны были открыты в 1957 г. в Национальном институте медицинских исследований в Лондоне как факторы устойчивости к вирусной инфекции. Было установлено, что клетки животных, подвергнутые воздействию вируса, выделяют в среду фактор, способный придавать свежим клеткам устойчивость к вирусной инфекции: он как бы препятствовал (интерферировал) размножению вирусов в клетке и в силу этой способности был назван *интерфероном*.

Известны три группы интерферонов:  $\alpha$ -интерфероны ( $\alpha$ -И), образующиеся при воздействии вирусов на лейкоциты;  $\beta$ -интерфероны ( $\beta$ -И), появляющиеся при воздействии вирусов на фибробласты;  $\gamma$ -интерфероны, продуцируемые Т-лимфоцитами в ответ на воздействие бактериальными и вирусными антигенами или антитысыворотками против поверхностных детерминант лимфоцитов.

Все интерфероны (кроме  $\alpha$ -И) гликопротеины; они представляют собой типичные глобулярные белки, причем на долю  $\alpha$ -спиральных структур приходится от 40 до 75 %. В  $\alpha$ -И обнаружены две дисульфидные связи. Интерфероны — низкомолекулярные белки из 146 — 166 аминокислотных остатков; видоспецифичны.

К числу наиболее хорошо исследованных интерферонов человека следует отнести  $\alpha$ -интерфероны; число генов, их кодирующих, примерно 20.  $\gamma$ -Интерферон в отличие от гетерогенного класса  $\alpha$ -интерферонов представлен всего одним индивидуальным белком, который кодируется одним геном. Менее ясна ситуация в отношении  $\beta$ -интерферонов. Выделен только один белок, соответствующий  $\beta$ -интерферону человека, — интерферон  $\beta_1$ ; ему соответствует практически вся противовирусная активность, обнаруживаемая после индукции фибробластов. Не исключено, что в геноме существует ряд генов, кодирующих различные  $\beta$ -интерфероны. Интерфероны — это как бы первая линия обороны против инфекции.

Интерфероны широко используются для лечения различных тяжелых заболеваний — острого вирусного гепатита, рассеянного склероза, остеосаркомы, миеломы и некоторых видов лимфом. Их применяют и для лечения меланом, ряда опухолей гортани, легких и мозга.

С учетом видоспецифичности интерферонов, предназначенных для лечения, необходимы такие препараты, которые получены из клеток человека. Традиционно их извлекают из крови человека (из 1 л крови можно выделить всего 1 мкг интерферона, т.е. примерно одну дозу для инъекции). Долгое время бóльшая часть мирового производства интерферонов осуществлялась в Финляндии (Хельсинки), а позже — во Франции. С 1980 г. одна из японских компаний наладила производство лимфобластоид-

ного интерферона из лимфобластоидных клеток. С этой целью культура данных клеток индуцировалась вирусом сендай, после чего интерферон выделяли с помощью хроматографических колонок, заполненных моноклональными антителами против получаемого интерферона. В Швеции лимфобласты выращивали в ферментерах объемом 2 000 л; полученные интерфероны очищали с помощью моноклональных антител.

Из всех видов интерферонов для мирового производства наиболее пригоден  $\beta$ -И. Фибробласты, получаемые из тканей плода, можно поддерживать в культуре клеток, что дает возможность массового производства. Метод получения  $\beta$ -интерферона был разработан в Англии.

В целом вышеперечисленные методы получения интерферонов характеризуются низким выходом, высокой стоимостью и недостаточной чистотой препарата. На современном этапе наиболее перспективный метод — биосинтез интерферонов с помощью генетически сконструированных микроорганизмов. Однако использование генно-инженерных технологий для получения интерферонов человека сопряжено с рядом трудностей. Во-первых, в смеси мРНК, кодирующих различные белки, содержание кодирующих интерферон чрезвычайно мало — всего около 0,1%. Тем не менее кДНК, полученные обратным транскрибированием, были клонированы в *E. coli*, что явилось революционным событием в теоретических и прикладных исследованиях интер-

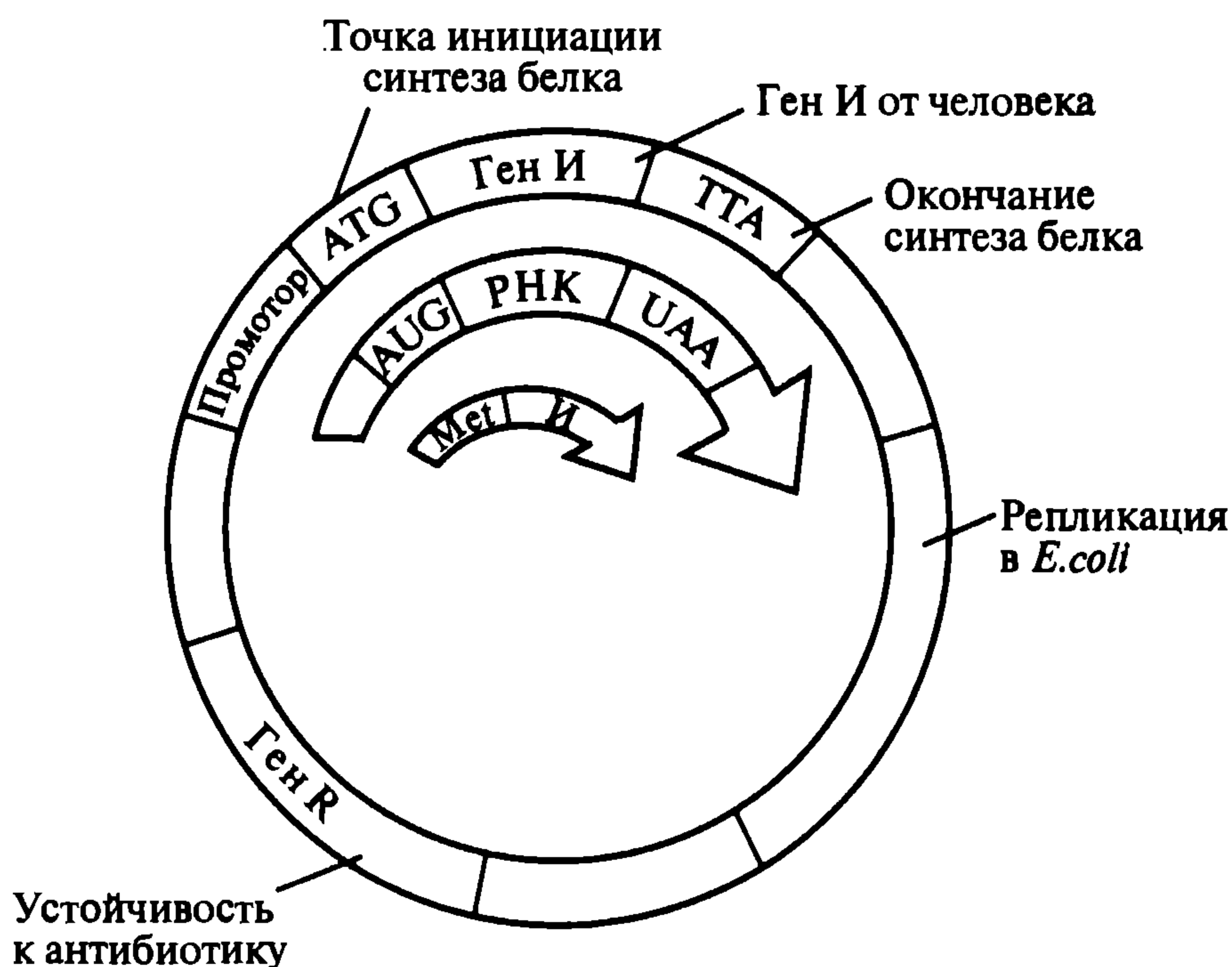


Рис. 5.15. Схема рекомбинантной плазмиды, обуславливающей синтез интерферона человека в *E. coli*

феронов. Ген интерферона был встроен в векторную ДНК, и к нему были присоединены бактериальные регуляторные элементы, программирующие его транскрипцию и трансляцию в бактериальной клетке (рис. 5.15).

Установлено, что интерфероны синтезируются в клетке сначала в виде предшественников, содержащих на N-конце полипептидной цепи сигнальный пептид, который затем отщепляется, и в результате образуется зрелый интерферон, обладающий полной биологической активностью. Бактерии не содержат ферментов, способных отщепить сигнальный пептид с образованием зрелого белка. Поэтому для того чтобы бактерии синтезировали зрелый интерферон, следует ввести в плазмиду только ту часть гена, которая его кодирует, и удалить часть гена, кодирующую сигнальный пептид. Данная процедура осуществлялась следующим образом. Ген интерферона содержит три участка расщепления рестриктазой *Sau 3A1*, из которых один находится рядом с сигнальной частью. Неполное расщепление гена этим ферментом позволяет выделить фрагмент гена, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую зрелый интерферон, но без первого цистеина. Триплет АТГ, кодирующий цистеин, отщепляется ферментом вместе с сигнальной частью. Для восстановления полинуклеотидной последовательности полного гена химически был синтезирован небольшой фрагмент ДНК, содержащий данный триплет, а также примыкающий к нему триплет АТГ — точка инициации синтеза белка. Этот фрагмент присоединили к изолированной части зрелого гена, и в результате был восстановлен полный ген зрелого интерферона. Реконструированный ген ввели в плазмиду таким образом, что с ним оказался рядом участок ДНК-промотор, обеспечивающий начало синтеза мРНК. Экстракты из *E. coli*, содержащие такую плазмиду, обладали противовирусной активностью.

Синтезированный генно-инженерным способом интерферон был выделен, очищен, и его физико-химические свойства оказались близкими свойствам интерферона, полученного из крови доноров. Удалось получить бактерии, способные синтезировать до 5 мг интерферона на 1 л бактериальной суспензии, содержащей примерно  $10^{11}$  бактериальных клеток, что в 5 000 раз превосходит то количество интерферона, которое можно извлечь из 1 л крови доноров. При использовании генно-инженерных технологий в разных лабораториях были получены штаммы бактерий, продуцирующих различные интерфероны:  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -типов. Недостаток использования *E. coli* для получения  $\beta$ - и  $\gamma$ -интерферонов — отсутствие в бактерии аппарата гликозилирования эукариотических белков, что приводит к синтезу негликозилированных молекул. И хотя роль гликозилирования неясна и негликозилированные

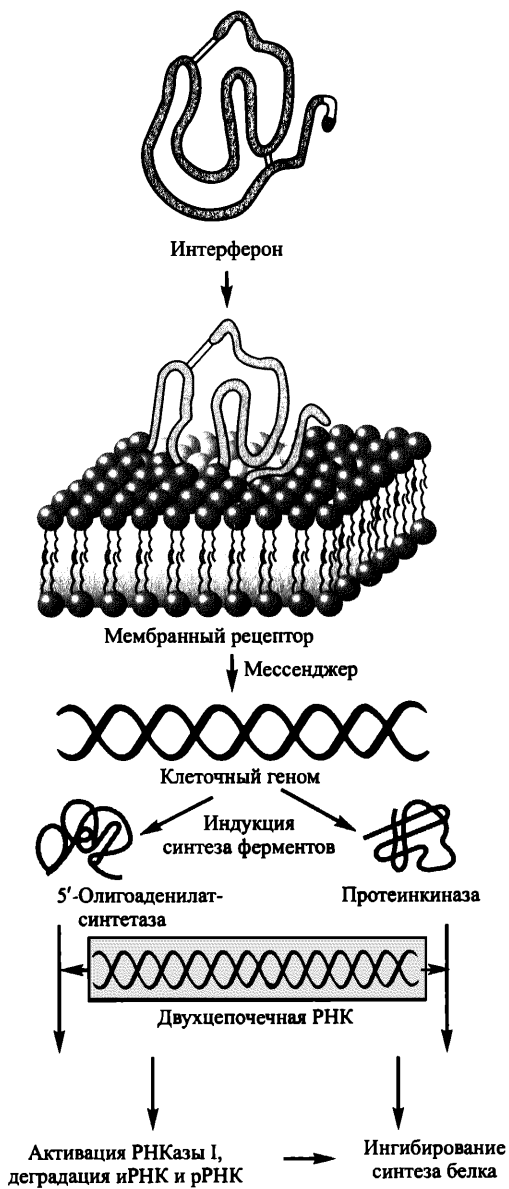


Рис. 5.16. Механизм действия интерферона

β- и γ-интерфероны практически полностью сохраняют противовирусную активность, эта особенность диктует осторожный подход к использованию генно-инженерных препаратов в медицинской практике.

В настоящее время гены интерферонов клонированы в дрожжи и клетки высших эукариот, способных осуществлять гликозилирование.

В 1981 г. в США впервые для синтеза лейкоцитарного интерферона человека были употреблены генетически сконструированные клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Полученная эффективная экспрессия гена *LeIF* и замена бактерий клетками дрожжей позволили увеличить производство интерферона в 10 раз.

Большое количество исследований было посвящено химическому синтезу гена, кодирующего ЛИЧ из 166 аминокислот. Соответственно, данный ген из 514 п. н. оказался самым крупным геном, синтезированным в 1982 г. группой английских ученых. В России в 1984 г. был осуществлен полный синтез гена α-И размером примерно 600 п. н. (Институт биоорганической химии).

Несмотря на успехи, достигнутые в области получения интерферонов с помощью генно-инженерных технологий и их применения для лечения различных вирусных заболеваний, в том числе онкологических, предстоит еще решить многие вопросы. На современном этапе не все гены интерферонов идентифицированы: обнаружены новые гены α<sub>L</sub>; мало известно о генах фибробластного интерферона (кроме гена β<sub>1</sub>); до конца не расшифрованы механизмы их биосинтеза и взаимодействия с другими веществами. Выяснение многих явлений, связанных с интерферонами, приведет к созданию новых средств для лечения ряда тяжелых заболеваний.

Схема биологического действия интерферона представлена на рис. 5.16.

Механизм действия интерферона можно свести к следующим основным этапам. Связываясь с клеточными рецепторами, интерфероны инициируют синтез двух ферментов: 2',5'-олигоаденилатсинтетазы и протеинкиназы за счет инициации транскрипции соответствующих генов. Оба фермента проявляют свою активность в присутствии двухцепочечных ДНК, являющихся продуктами репликации многих вирусов или содержащихся в их вирионах. Фермент 2',5'-олигоаденилатсинтетаза катализирует синтез 2',5'-олигоаденилатов (из АТР), которые активируют клеточную рибонуклеазу I; протеинкиназа фосфорилирует (и тем самым активирует) фактор инициации трансляции IF<sub>2</sub>. В результате этих событий ингибируются биосинтез белка и размножение вируса (деградация иРНК и рРНК) в инфицированной клетке, что вызыва-

ет ее лизис. Вероятны и другие механизмы действия интерферонов, например, инактивация тРНК, нарушение процессов метилирования и др.

## **5.10. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ**

### **5.10.1. Проблемы биобезопасности**

Генно-инженерные методы, в частности технология рекомбинантных ДНК, позволяют создавать новые генотипы и, следовательно, новые формы растений гораздо быстрее, чем классические методы селекции. Кроме того, появляется возможность целенаправленного изменения генотипа — трансформации — благодаря введению определенных генов.

Считается, что трансгенные растения более безопасны, чем сорта, полученные методами традиционной селекции, но с применением мутагенеза (В. Ф. Федоренко и др., 2005). Есть мнение, что риск использования трансгенных растений в мирных биотехнологиях намного ниже, чем в случае применения других трансгенных организмов (Я. И. Бурьянов, 1999). Генетическая инженерия растений развивается очень быстрыми темпами. Она позволяет решать проблемы фундаментальной науки, а также многочисленные практические задачи. Намечается тенденция разделения прикладных генно-инженерных исследований на три направления:

1. Решение проблем сельскохозяйственного комплекса, таких, как повышение продуктивности сельскохозяйственных растений, их защита от различных биотических и абиотических факторов. Это особенно важно в связи с быстрым ростом населения Земли. Считается, что генетически модифицированные (ГМ) растения помогут решить проблему увеличения производства продуктов питания, поэтому сейчас наблюдается весьма значительное расширение сельскохозяйственных угодий, занятых посевами ГМ-растений. Если в 1996 г. эти посевы занимали 1,7 млн га, то в 2001 г. — 52,6 млн га, а в 2003 г. — почти 70 млн га.

2. Создание трансгенных растений — продуцентов новых веществ для использования в области медицины и технической промышленности, приспособленных для роста в полевых условиях. Так, на основе трансгенных растений возможно получение «съедобных» вакцин, антител (например, иммуноглобулиновых комплексов).

3. Развитие и совершенствование культуры трансгенных клеток и тканей растений, синтезирующих ценные биологически актив-

ные соединения. Довольно часто продуцентами важных пищевых, лекарственных или технически важных веществ служат уникальные тропические и эндемические растения, не доступные для выращивания в других климатических зонах или занесенные в «Красную книгу». Перенос генов, отвечающих за синтез специфических соединений, из редких растений в более доступные превращает последние в биологические фабрики необходимых веществ.

Генетическая трансформация может принести большую пользу для сельского хозяйства, медицины, промышленности, фундаментальной науки.

Однако биотехнология и, в частности, генетическая инженерия подошли к той ступени развития, когда приходится прежде всего думать о возможных последствиях эксперимента, об использовании полученных знаний. «Генетическая инженерия — это мощный способ изменить жизнь, но ее потенциал может представлять собой опасность» (Р. Доукинс, цит.: Современная биотехнология. Мифы и реальность, 2004). В связи с этим первостепенными становятся вопросы биологической безопасности.

Под биологической безопасностью понимается защищенность человека, общества, цивилизации и окружающей среды от вредного воздействия, опасного для жизни и здоровья людей, от токсичных и аллергенных биологических веществ и соединений, содержащихся в природных или генетически модифицированных биологических объектах и полученных из них продуктах (О. С. Машкина, А. К. Буторина, 2005). В настоящее время выделяют три группы риска, возникающие при возделывании и потреблении генетически модифицированных организмов (ГМО): пищевые, экологические, агротехнические. Причины возникновения этих рисков состоят в непредсказуемости встраивания дополнительной ДНК в геном организма, возможности плеiotропного эффекта встроенного гена, нарушении стабильности генома трансгенных растений, присутствии во встраиваемой конструкции «лишних» векторных генов, аллергических и токсических эффектах чужеродного белка, возможности горизонтального переноса трансгенных конструкций в геном симбионтных для человека и животных бактерий (В. В. Кузнецов и др., 2004). По-видимому, есть закономерность между увеличением числа аллергических заболеваний и потреблением ГМ-продуктов в странах, где это потребление разрешено. Так, в США и Скандинавии был проведен сравнительный анализ количества пищевых заболеваний. Эти страны были выбраны в связи с тем, что единственным существенным различием в качестве питания были потребление генетически модифицированных продуктов в США и их отсутствие в рационе народов Скандинавии. Оказалось, что в США частота пищевых заболеваний в 3 — 5 раз выше,



чем в странах Скандинавии (В. В. Кузнецов и др., 2004). Нельзя исключить, что генетическая инженерия может привести к результатам, опасным для человека и природы. Поэтому несомненно, что биологическая безопасность должна стать одной из приоритетных задач человечества в целом и каждой цивилизованной страны в отдельности (А.С.Спирин, 1997, цит.: В.В.Кузнецов и др., 2004).

### 5.10.2. Получение трансгенных растений

Технологии получения трансгенных растений практически совпадают с теми технологиями, которые обсуждались в учебном пособии, когда речь шла о передаче генетической информации у микроорганизмов и животных. Поэтому в данном разделе рассмотрим только те системы, которые специфичны для растительных организмов.

**Векторы на основе Ti-плазмид.** Перенос генов и их встраивание в геном двудольных растений (трансформация) осуществляются главным образом благодаря конструированию векторов, характерных для растений. Эти векторы создаются на основе Ti-плазмид, находящихся в клетках бактерий *Agrobacterium tumefaciens*.

Среди многочисленных почвенных бактерий существуют бактерии рода *Agrobacteria*, которые могут передавать часть своих генов в геном растительной клетки, вызывая коренные изменения в ее свойствах. Так, бактерия *A. tumefaciens* вызывает образование опухолей — корончатых галлов. Способность этой бактерии к образованию опухоли связана с геномом большой внехромосомной плазмиды — Ti-плазмиды (от англ. *tumor inducing* — индуцирующие опухоль). Другие бактерии (*A. rhizogenes*) вызывают усиленное образование корней при заражении растений. За этот процесс ответственны содержащиеся в бактериальных клетках Ri-плазмиды (от англ. *root inducing* — индуцирующий корни). Ti- и Ri-плазмиды — естественные векторы для дополнительных генов, обладающие свойствами, которые необходимы для трансформации растительных клеток. Они имеют широкий круг хозяев, а в бактериальных клетках реплицируются автономно. Ri-плазмиды выгодно отличаются от Ti-плазмид тем, что они не онкогенны. Клетки растений, трансформированные с помощью Ri-плазмид, сохраняют способность к морфогенезу и регенерации растений. В связи с этим Ri-плазмиды в данный момент рассматриваются как более перспективные для создания векторов. Однако Ti-плазмиды изучены лучше, поэтому их, как правило, используют при работе с растениями.

Доказательством того, что именно Ti-плазмиды отвечают за трансформацию растительных клеток в опухолевые, служит тот факт, что клетки агробактерий, лишенные Ti-плазмид, не могут вызвать в инфицированном растении ни образования корончатых галлов, ни синтеза опинов. Опины — это уникальные продукты конденсации amino- и кетокислот или аминокислот и сахаров, которые используются бактериями в качестве источников азота, углерода и энергии.

После заражения часть Ti-плазмиды встречается в хромосомах клеток растения-хозяина. Следовательно, *A. tumefaciens* встраивает часть своего генома в ДНК растительной клетки и заставляет ее таким способом изменять метаболизм, синтезируя вещества, необходимые для бактерий. Сама бактерия в растительную клетку не проникает. Она остается в межклеточном пространстве, используя трансформированные клетки растений в качестве биологической «фабрики» по производству опинов.

Участок Ti-плазмиды, который встраивается в геном растительных клеток, называется Т-ДНК — трансформирующая ДНК (transferred DNA). Величина Т-ДНК составляет примерно 10% от размера всей Ti-плазмиды, т.е. 12—22 тыс. п.н. Т-ДНК содержит гены, отвечающие за индукцию образования опухоли, синтез опинов и фитогормонов (ауксинов и цитокининов), подавляющих дифференцировку клеток растения-хозяина. Гены, отвечающие за вырезание Т-ДНК и ее перенос в растительную клетку, расположены в области вирулентности (vir-область) той же самой плазмиды. Кроме того, в состав Ti-плазмиды входят гены tra-области, контролирующие конъюгацию бактерий, и гены ori-области, продукты которых обеспечивают репликацию Ti-плазмиды (рис. 5.17).

Молекулярно-генетический механизм естественной трансформации растительных клеток с помощью Ti-плазмид изучен достаточно хорошо. В этом процессе можно выделить несколько этапов:

1) восприятие раневых сигналов растительной клетки хеморецепторами бактерии и прикрепление агробактерии к стенке клетки растения;

2) вырезание Т-ДНК из Ti-плазмиды;

3) проникновение Т-ДНК внутрь клетки растения;

4) интеграция Т-ДНК в геном растения и ее экспрессия.

Трансформация начинается только там, где есть поврежденные клетки. Весь процесс «узнавания» нужной растительной клетки, вырезания, транспорта и встраивания Т-ДНК в растительный геном осуществляют белки — продукты генов, локализованных в vir-области Ti-плазмиды. Продукты гидролиза поврежденной клеточной стенки (ацетосирингон и гидроксиацетосирингон) вос-

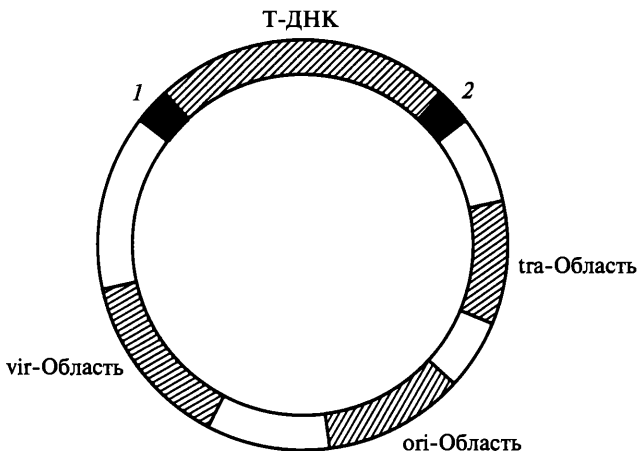


Рис. 5.17. Схема расположения некоторых областей генов в Ti-плазмиде: Т-ДНК — трансформирующая ДНК, являющаяся опухолеобразующим агентом плазмиды и содержащая гены, которые транскрибируются и транслируются только в растительных клетках; vir-область — область, содержащая гены, которые отвечают за вырезание и перенос Т-ДНК в растительную клетку; ori-область — область, контролирующая репликацию Ti-плазмиды; tra-область — область, содержащая гены, продукты которых контролируют конъюгацию бактерий; 1 и 2 — соответственно левая и правая фланкирующие последовательности, ограничивающие Т-ДНК

принимают хеморецепторы, встроенные в плазматическую мембрану агробактерии. Среди них одна из главных ролей принадлежит продукту деятельности генов vir-области — гистидиновой протеинкиназе, которая активирует транскрипцию остальных vir-генов. Индукция этих генов обратима, что очень важно для бактерий. Если растительный организм ослаблен или вообще нежизнеспособен, процесс останавливается и Т-ДНК не переносится в такую клетку. Другой продукт генов vir-области — эндонуклеаза, которая отвечает за вырезание Т-ДНК. Белки virB и virE транспортируют Т-ДНК в одноцепочечной форме из бактерии в цитоплазму растительной клетки. Механизм переноса Т-ДНК, по-видимому, аналогичен переносу плазмидной ДНК в процессе конъюгации. Встраивание Т-ДНК в геном клетки растения становится возможным благодаря наличию гомологичных участков между растительной и плазмидной ДНК в местах встраивания. После внедрения Т-ДНК становится обычной частью генома растения и наследуется как доминантный признак в соответствии с законами Менделя (рис. 5.18).

Именно способность участка Ti-плазмиды *A. tumefaciens* встраиваться и экспрессироваться в геноме растительной клетки послужила поводом для попытки создания на основе этой плаз-

миды вектора, доставляющего дополнительные гены в клетку. Т-ДНК ограничена с двух сторон повторяющимися последовательностями (фланкирующими последовательностями), по которым и происходит вырезание этого участка ДНК из плазмиды. Кажется бы, что любая ДНК, встроенная между этими последовательностями, будет принята за Т-ДНК и перенесена в растительную клетку любых двудольных растений.

Однако, Ti-плазмида как вектор обладает некоторыми недостатками: большие размеры Ti-плазмиды (от 200 до 800 тыс. п. н.); отсутствие способности реплицироваться в клетках *E. coli*, что необходимо для клонирования рекомбинантных плазмид; неспособность трансформированных с помощью Ti-плазмид клеток к регенерации целого растения; неспособность к трансформации клеток почти всех однодольных растений. Основной недостаток — слишком большие размеры Ti-плазмиды, которые делают весьма затруднительными манипуляции с ней во время конструирования вектора. Для решения этой проблемы разработана технология

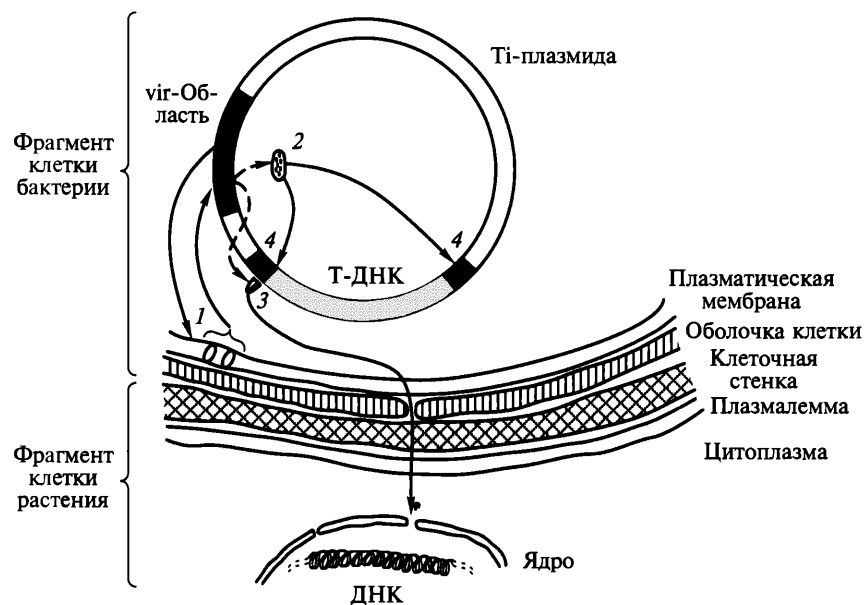


Рис. 5.18. Схема внедрения Т-ДНК в растительную клетку:

1 — гистидиновая протеинкиназа; 2 — эндонуклеаза; 3 — белки, транспортирующие Т-ДНК из бактерии в растение; 4 — повторяющиеся последовательности, ограничивающие Т-ДНК (фланкирующие последовательности). Пунктирные линии означают, что данный белок является продуктом деятельности генов *vir*-области; сплошные линии показывают направление действия соответствующих белков

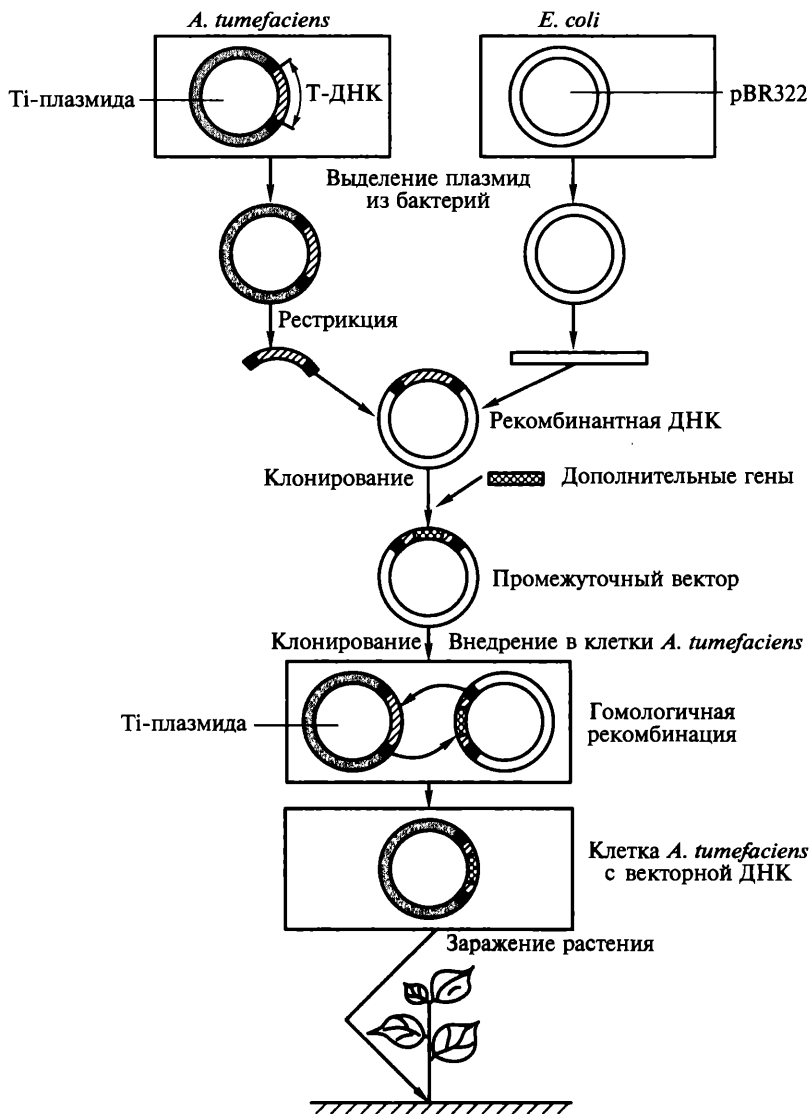


Рис. 5.19. Схема получения трансгенного растения с помощью вектора, созданного на основе Ti-плазмиды (пояснения см. в тексте)

создания *промежуточного вектора* с применением классического объекта генетической инженерии — *E. coli*.

Процесс начинается с создания рекомбинантной структуры, которую можно достаточно просто клонировать, т. е. многократно увеличивать число ее копий. Т-ДНК вырезают с помощью ре-

стриктаз из Ti-плазмиды и встраивают в небольшую плазмиду рBR322, способную реплицироваться в клетках *E.coli*. В этих клетках рекомбинантную ДНК клонируют, после чего встраивают в Т-ДНК дополнительные гены и повторяют клонирование. Полученные многочисленные копии промежуточной векторной ДНК вводят в клетки *A. tumefaciens*, содержащие обычные Ti-плазмиды. В результате гомологичной рекомбинации Т-ДНК с встроенными в нее дополнительными генами замещает нормальную Т-ДНК в Ti-плазмидах. После этого отбирают с помощью генов-маркеров трансформированные агробактерии и заражают ими растительные клетки. Дополнительные гены вместе с Т-ДНК встраиваются в геном растения, и в конце концов образуется генетически модифицированный организм с заданными свойствами (рис. 5.19). Эту довольно сложную технологию можно упростить, если использовать бинарные векторы.

**Бинарные векторы** представляют собой бактерии, содержащие две разные Ti-плазмиды. Одна из них несет *vir*-область и обеспечивает интеграцию в геном растительной клетки Т-области, содержащей любые гены другой плазмиды. В этом случае двойной кроссинговер не требуется.

**Векторы на основе ДНК-содержащих вирусов растений.** Вирусы можно рассматривать как разновидности чужеродной нуклеиновой кислоты, которые реплицируются и экспрессируются в клетках растений. Подавляющее большинство фитовирусов в качестве носителя генетической информации содержат РНК. Только 1 — 2 % вирусов, инфицирующих растения, относятся к ДНК-содержащим. Именно эти вирусы удобны для использования в технологии рекомбинантных ДНК, а также в качестве векторов.

ДНК-содержащие вирусы могут включать одноцепочечную или двухцепочечную ДНК. В качестве представителей первой группы можно назвать вирус золотистой мозаики фасоли (ВЗМФ) или вирус полосатости кукурузы. Наиболее изученный представитель группы вирусов с двухцепочечной ДНК — вирус мозаики цветной капусты (ВМЦК), поражающий в основном растения семейства крестоцветные.

Обычно фитовирусы реплицируются с образованием большого числа копий молекул нуклеиновых кислот —  $10^6$  и более молекул на зараженную клетку. Поэтому фитовирусы представляют собой очень эффективные средства для получения хорошей экспрессии чужеродного гена. Кроме высокой копийности вирусной нуклеиновой кислоты вирусные векторные системы имеют еще ряд преимуществ: малый размер генома (возможность легкой манипуляции вирусной ДНК) и сильные промоторы, обеспечивающие эффективную экспрессию чужеродных генов.

Однако вирусы в качестве векторов обладают и существенными недостатками: имеют небольшую емкость, патогенны и неспособны встраиваться в хромосомы хозяина. Небольшую емкость можно увеличить, если инфицировать вирусом (например, ВМЦК) растительные протопласты, а не клетки. В этом случае инфекция не передается от клетки к клетке, нет необходимости в упаковке ДНК в вирусные частицы. Следовательно, часть вирусного генома, ответственная за упаковку в вирусные частицы, может быть удалена и замещена дополнительной чужеродной ДНК. Другой недостаток — отсутствие способности встраиваться в геном растительной клетки — удается обойти (по крайней мере для ВМЦК) благодаря специальному методическому приему — агроинфекции. Для этого геном ВМЦК встраивают в Т-область Ti-плазмиды и в ее составе интегрируют в ядерный геном различных растений.

**Методы прямого переноса генов в растение.** Эти методы стали использоваться для растений благодаря появлению специфического объекта — изолированных протопластов, т. е. клеток, лишенных целлюлозной стенки.

Методы прямого переноса генов довольно многочисленны:

1. Трансформация растительных протопластов. Метод осуществляется благодаря комбинации методик кальциевой преципитации ДНК и слияния протопластов. Для трансформации может быть использован практически любой ДНК-вектор. Донорная ДНК может не содержать специальных биологических сигналов (vir-областей, пограничных областей Т-ДНК).

2. Заражение культуры протопластов на начальной стадии ее роста агробактериями, которые используют в качестве векторов.

3. Микроинъекции ДНК. Этот метод аналогичен методу микроинъекций животных клеток. Его можно рассматривать как наиболее универсальный. Эффективность трансформации растительных клеток — 10—20 % независимо от типа вектора. Трансформация не видоспецифична, возможен перенос генов в любое растение.

4. Электропорация. Метод основан на повышении проницаемости биомембран за счет действия импульсов высокого напряжения. В результате молекулы ДНК проникают в клетки через поры в клеточной мембране.

5. Упаковка в липосомы. Это один из методов, позволяющих защитить экзогенный генетический материал от разрушения нуклеазами растительной клетки. Липосомы — сферические тельца, оболочки которых образованы фосфолипидами.

6. Метод биологической баллистики. Это один из самых эффективных методов трансформации однодольных растений. Исходный материал для трансформации — суспензионная культура, каллус-



ная ткань или 4—5-дневные культивируемые незрелые зародыши однодольных.

Метод основан на напылении ДНК-вектора на мельчайшие частички вольфрама, которыми затем бомбардируют клетки. Бомбардировка осуществляется с помощью биолистической пушки за счет перепада давления. Часть клеток гибнет, а выжившие клетки трансформируются, затем их культивируют и используют для регенерации растений.

### **5.10.3. Применение методов генетической инженерии для улучшения аминокислотного состава запасных белков растений**

Решение проблемы создания новых форм растений подразумевает в первую очередь повышение качества синтезируемых растением продуктов, которые определяют его питательную и техническую ценность. В основном это касается запасных белков.

В большинстве случаев запасные белки растений имеют несбалансированный для питания человека и животных аминокислотный состав. Так, запасные белки злаков — проламины — бедны лизином, триптофаном и треонином, что снижает их питательную и кормовую ценность. Улучшение аминокислотного состава белка путем традиционной селекции не дает желательных результатов, поскольку необходимые гены часто сцеплены с нежелательными признаками и наследуются вместе. Например, у мутантов кукурузы и ячменя повышение содержания лизина коррелировало с уменьшением синтеза основных запасных белков — зеина и гордеина, а также с уменьшением урожайности.

Операции по получению трансгенных растений с улучшенным аминокислотным составом белка разделены на ряд этапов: 1) клонирование генов запасных белков; 2) изучение механизмов тканеспецифичной и временной экспрессии белков и выявление последовательностей ДНК, определяющих данный механизм; 3) целенаправленное изменение последовательностей генов запасных белков для улучшения аминокислотного состава; 4) создание векторов, содержащих измененный ген; 5) введение модифицированных генов в растения.

В настоящее время клонированы 10 генов гордеинов ячменя, гены  $\alpha$ - и  $\beta$ -глиадинов и глютеина пшеницы, зеинов кукурузы, легумина бобовых, пататина картофеля и ряд других. Имеются практические результаты трансформации растений. Так, введение в геном пшеницы модифицированного гена проламина привело

к активному синтезу модифицированного белка, а также повлияло на состав и уровень соответствующих запасных белков. В итоге улучшилось хлебопекарное качество пшеничной муки.

#### 5.10.4. Повышение эффективности процесса фотосинтеза

Один из возможных способов увеличения фотосинтеза и, следовательно, продуктивности растений состоит в клонировании хлоропластных генов в клетках бактерий и их переносе в растения. Известно, что хлоропласты и прокариотические клетки сходны по ряду признаков. На основании этого возникла симбиотическая гипотеза происхождения хлоропластов, впервые выдвинутая А. С. Фаминциным (1886). Согласно этой гипотезе, клетки прокариот и хлоропласты сходны. В них присутствуют кольцевые ДНК, 70S-рибосомы; синтез белков начинается с одной и той же аминокислоты — N-формилметионина, а синтез белка подавляется хлорамфениколом, а не циклогексимидом, как у эукариот. Позже было показано, что ДНК-зависимая РНК-полимераза *E. coli* связывается с определенными участками ДНК хлоропластов шпината.

В клетках *E. coli* инициация белкового синтеза частично регулируется доступностью участка связывания рибосом (УСР). Его структура до конца еще не выяснена, но расшифрован участок, известный под названием «последовательность Шайн — Дальгарно» (ШД). Она комплементарна 3'-концу 16S-рибосомальной РНК, и инициация белкового синтеза начинается с образования комплементарной пары между этой последовательностью и 3'-концом 16S-рибосомальной РНК. Анализ последовательности ДНК хлоропластного гена большой субъединицы основного фермента фотосинтеза — рибулозобисфосфаткарбоксилазы — оксигеназы (Рубиско) кукурузы — выявил значительные гомологии с известными промоторами и последовательностями ШД клеток *E. coli*. Все это привело к попытке клонирования генов хлоропластов в клетках *E. coli*, наиболее часто используемой в генно-инженерных исследованиях.

Транскрипционные конструкции могут создаваться двумя путями: во-первых, это установка промотора рядом с УСР, который узнается полимеразой *E. coli*, во-вторых, это формирование гибридного УСР, состоящего из прокариотической последовательности ШД и эукариотического или синтетического иницирующего кодона. Первый путь широко применяется для увеличения экспрессии генов *E. coli* и хлоропластных генов в клетках *E. coli*.

В настоящее время уже клонировано несколько хлоропластных генов: гены синтеза субъединиц Рубиско, белка хлорофилл-белкового комплекса, АТФсинтетазы, цитохрома и др.

### 5.10.5. Генно-инженерные подходы к решению проблемы усвоения азота

Азот — один из самых необходимых элементов для растений. Его недостаток в почве или питательном субстрате часто приводит растение к гибели, поэтому в первую очередь необходимо внесение в почву азотных удобрений. Однако их производство требует очень больших энергетических затрат, поэтому оно дорогостояще. Стоимость азотных удобрений в 6 раз выше стоимости фосфорных удобрений и в 16 раз выше стоимости калийных удобрений. При этом растения используют только от 30 до 70 % внесенных в почву доступных форм азота, остальное просто вымывается из почвы, загрязняя окружающую среду. Гораздо более естественно и доступно снабжение растений азотом путем его биологической фиксации.

Фиксация атмосферного азота (диазототрофность) — свойство прокариотических организмов. Азотфиксирующие организмы делятся на симбиотические (90 %) и свободноживущие (10 %). Фиксация атмосферного азота связана преимущественно с симбиотическими микроорганизмами. В настоящее время известны четыре основные системы симбиоза, имеющие большое значение не только для естественных сообществ, но и для сельского хозяйства, лесоводства. Это *Rhizobia* — бобовые растения, *Azolla-Anabaena* — рис, *Actinomyces* — деревья, *Spirillum* — травы. Атмосферный азот фиксируется благодаря уникальному ферменту — нитрогеназе.

В 1960 г. американские исследователи показали, что нитрогеназа сохраняет свою активность в бесклеточных экстрактах *Clostridium pasteurianum*. Это послужило толчком для начала активных исследований биохимии азотфиксации, структуры и механизма действия нитрогеназы. К 1981 г. нитрогеназа была выделена из 36 видов микроорганизмов. Она считается одним из наиболее сложных ферментов, использующих простые субстраты. Кроме азота нитрогеназа может восстанавливать ацетилен, цианистый водород, закись азота и некоторые другие соединения. Восстановление ацетилена в этилен позволило разработать надежный тест для обнаружения азотфиксирующей активности. Непременное условие работы нитрогеназы — ее защита от кислорода, который ингибирует не только активность нитрогеназы, но и ее биосинтез.

Начиная с 1970 г. стали появляться серьезные работы по изучению генов азотфиксации и их переносу в клетки *Klebsiella pneumoniae* и *E. coli*. С помощью техники рекомбинантных ДНК были составлены генетические карты генов азотфиксации (*nif*-генов), которые показали сходную организацию генов у большей части азотфиксирующих организмов. Было установлено, что *nif*-гены расположены между генами, кодирующими биосинтез гистидина (*his*) и генами, ответственными за усвоение шикимовой кислоты (*shiA*). Гены, кодирующие синтез белковых субъединиц компонентов нитрогеназы, образуют единый оперон (рис. 5.20). В клетках симбиотических бактерий *Rhizobium leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. trifolii* плазмиды, кроме структурных генов нитрогеназы, содержат гены, отвечающие за развитие корневых клубеньков у определенных видов бобовых.

Конструирование плазмид, несущих *nif*-гены, позволяет передавать способность к фиксации азота организмам, не обладающим этим свойством. Среди бактерий, кроме *E. coli*, такой перенос осуществлен для бактерий *Salmonella typhimurium*, *Erwinia herbicola* и других. Однако подобные манипуляции могут приводить к нежелательным эффектам. Так, перенос генов в штамм *Erwinia* (бактерии, вызывающие гниение растений) может усилить его патогенное действие. Кроме того, существует вероятность случайного переноса вместе с *nif*-генами каких-то нежелательных генов.

В настоящее время внимание ученых привлекают проблемы введения генов азотфиксации в клетки растений, создания ризоценозов между небобовыми растениями (особенно злаками) и азотфиксирующими организмами, повышения мощности корневой системы бобовых растений для увеличения на ней количества клубеньков. Кроме того, предполагается создание новых азотфиксирующих систем путем введения азотфиксирующих микроорганизмов в каллусные ткани растений с последующим образованием из них растений-регенерантов, а также повышение эффективности фиксации азота путем воздействия на гены, контролирующие этот процесс.

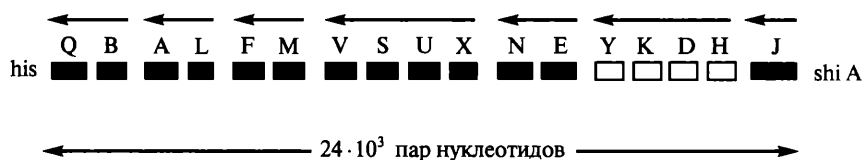


Рис. 5.20. Генетическая карта области *nif*-генов хромосомы *Klebsiella pneumoniae* (по А. Сассон, 1987). Оперон HDKY кодирует белки нитрогеназы; стрелки обозначают направление транскрипции

Наиболее интересна первая проблема — введение *nif*-генов в клетки растений. Однако ее решение сопряжено с рядом трудностей. Основная — разрушение нитрогеназы под воздействием кислорода. У азотфиксирующих микроорганизмов существует ряд приспособлений, защищающих бактерии от свободного кислорода. Среди них присутствие в клетках клубеньков леглоблина — гемсодержащего белка, который встраивается в мембрану бактериоида (увеличенной в размере бактериальной клетки, характеризующейся наибольшей способностью к фиксации азота) и регулирует поступление кислорода. Леглоблин кодируется в геноме растительной клетки-хозяина, но его синтез начинается только после проникновения бактерий в эту клетку. У цианобактерий механизм защиты нитрогеназы от кислорода иной. Азотфиксация идет в гетероцистах, а фотосинтез — в обычных клетках. Поэтому кислород, выделяющийся в процессе фотосинтеза, не ингибирует фиксацию азота. Введение только *nif*-генов в какую-то растительную клетку не решает проблемы. Если нитрогеназа будет синтезироваться в этой клетке, в частности в клетках злаков, то она разрушится под действием кислорода, присутствующего в клетке. Кроме того, сама клетка, в которую переносят гены азотфиксации, может быть не приспособлена к синтезу и расходованию большого количества энергии, которое требуется для фиксации азота.

Таким образом, более перспективно повышение эффективности фиксации азота в уже существующих природных системах за счет воздействия на гены, контролирующие этот процесс, а также увеличение мощности корневой системы бобовых растений и создание новых азотфиксирующих систем с помощью методов клеточной инженерии.

## 5.10.6. Изменение качества плодов

В настоящее время найдены способы регулирования сроков созревания плодов с помощью методов генетической инженерии. Для этого используют метод создания антисмысловой РНК, который позволяет управлять работой интересующего гена. В растениях ген *PG* контролирует синтез полигалактуроназы — фермента, который участвует в разрушении пектина. Данный фермент синтезируется в период созревания плодов томата, они становятся мягкими, что значительно сокращает срок их хранения. Отключение гена *PG* позволяет получить растения с новыми свойствами — увеличенным сроком хранения и более высокой устойчивостью к грибным заболеваниям. Эту же технологию можно применить для регулирования активности другого гена — гена *EFE*, продуктом которого является фермент, участвующий в био-

синтеза этилена — фитогормона, одной из функций которого служит ускорение созревания плодов. Отключение данного гена также может увеличить срок хранения плодов.

### 5.10.7. Устойчивость растений к гербицидам

В сельском хозяйстве широко используют гербициды — химические соединения, применяемые для уничтожения сорной растительности. Гербициды широкого спектра действия могут не только уничтожать сорняки, но и угнетать рост культурных растений. В связи с этим возникает необходимость в создании растений, устойчивых к данным веществам. Существует два подхода к решению этой проблемы: прямая селекция устойчивых к гербицидам мутантных форм растений, или мутантных клеточных штаммов (клеточная селекция), и генно-инженерный метод, который состоит во введении в растения генов гербицид-резистентности растительного или бактериального происхождения.

Изучение механизмов устойчивости служит основой для создания трансгенных растений. Оно включает четыре основных этапа: выявление мишеней действия гербицидов в клетке растений; отбор растений, устойчивых к данному гербициду в качестве источника генов резистентности; идентификация и клонирование этих генов; изучение их экспрессии для использования в трансгенных конструкциях.

Благодаря использованию методов генетической инженерии были созданы новые, устойчивые к различным гербицидам сельскохозяйственные культуры. В геном этих культур вводились мутантные гены, кодирующие синтез ферментов, на которые гербициды (атразин, бромоксилин, имидазол) не оказывают негативного действия. Например, растения лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus*) были трансформированы с помощью штамма A281/pCBE21. Эта бактерия содержит плазмиду с встроенным геном *bar*, кодирующим фермент, придающий устойчивость к гербициду биалофосу. Трансгенные растения содержали ген *bar* и были невосприимчивы к гербициду (А. М. Стефанович, Г. Н. Ралдугина, 1999). Однако в тканях таких растений наблюдается накопление гербицидов, и использовать эти растения можно только в технических целях. Вместе с тем было показано, что введение генов, кодирующих другие ферменты, позволяет проводить детоксикацию гербицидов, создавая таким образом растения, пригодные в пищу. Так, детоксикация действующего вещества гербицида 2,4-D осуществляется при переносе в растение гена монооксигеназы, глифосата — при введении гена фосфонатазы, бромоксилина — гена нитрилазы.

## 5.10.8. Устойчивость растений к фитопатогенам и насекомым

Необходимость создания растений, устойчивых к фитопатогенам, связана с тем, что насекомые-вредители, вирусные и другие заболевания служат причиной значительного снижения урожайности сельскохозяйственных культур.

Наибольший урон растениям наносят грибные, бактериальные и вирусные патогены, насекомые-вредители. В растении существуют защитные механизмы, которые в большей или меньшей степени (в зависимости от устойчивости растений) начинают действовать в ответ на проникновение фитопатогенов в клетку. Во-первых, начинается синтез соединений, вызывающих гибель патогенов. Примером могут служить специфические белки PRP (pathogen related proteins). Из них наиболее изучены ферменты хитиназы и  $\beta$ -1,3-глюконазы, которые угнетают рост грибов и некоторых видов бактерий, разрушая их клеточные стенки. Во-вторых, могут создаваться структурные барьеры, препятствующие распространению инфекции. Это достигается благодаря лигнификации клеточных стенок. Той же цели — защите клеток — служит присутствие в клеточных стенках белков-экстензинов и олигосахаридов.

Применение методов генетической инженерии, использующих естественные защитные механизмы, позволяет получать трансгенные растения, устойчивые к грибной, бактериальной и вирусной инфекции. Так, гены хитиназы и глюконазы кодируются одиночными генами. Благодаря этому были получены трансгенные растения табака и турнепса, в состав генома которых ввели ген хитиназы. Лабораторные и полевые испытания выявили большую устойчивость трансгенных растений. В растения томатов был введен ген защитных пептидов редьки (дефензинов) *rs*, отвечающих за устойчивость к фитопатогенным грибам. Наконец, перспективны клонирование и перенос генов, кодирующих специфические белки (small antibiotic-like proteins), содержащиеся в семенах многих растений. Эти белки защищают семена в период покоя и во время прорастания от грибных и бактериальных инфекций.

Другой подход к получению трансгенных растений, устойчивых к вирусной инфекции, состоит во введении в геном исходных растений гена оболочки вируса. Это приводит к ингибированию размножения вируса и снижению инфицированности. Благодаря такому подходу был получен стойкий антивирусный эффект у растений табака, трансформированных геном оболочки вируса табачной мозаики (ВТМ).

Еще одна группа методов получения трансгенных растений, устойчивых к действию фитовирусов, включает введение и экспрес-

сию генов антивирусных антител, вирусных сателлитных РНК. Интересный эффект дало введение в геном растений гена человеческого интерферона JFN — одного из ключевых белков индукции иммунитета у млекопитающих. С помощью вируса мозаики цветной капусты геном интерферона были трансформированы растения турнепса, табака, картофеля, что повысило устойчивость этих растений к вирусным заболеваниям.

Вполне традиционным для придания устойчивости к насекомым-вредителям стало внесение в растения гена *Bt* бактерий *Bacillus thuringiensis*. Этот ген отвечает за синтез белка протоксина, который при попадании в кишечник личинок насекомых разрушается. Продукт данного ферментативного расщепления —  $\delta$ -эндотоксин — вызывает гибель насекомых. Интерес к этой группе белков вызван их широким спектром действия. Найдены новые классы эндотоксинов, которые токсичны к клещам, нематодам, одноклеточным паразитирующим микроорганизмам и т.д. Более того, в настоящее время сконструирован искусственный ген *bt*, более эффективный, с более широким спектром устойчивости по сравнению с природным геном.

Другой путь повышения устойчивости растений к вредителям, в частности к фитопатогенным грибам, — это экспрессия в клетках растений генов — ингибиторов протеиназ. Для данной цели перспективно использование гетерологичных генов растений, так как многие ткани и органы растений содержат ингибиторы, специфически настроенные против протеиназ насекомых и грибов, но безвредных для человека и животных.

Еще одно направление создания трансгенных устойчивых растений связано с повышением их иммунитета. У устойчивых растений в ответ на атаку патогенов происходит изменение метаболизма: накапливаются перекись водорода, салициловая кислота, фитоалексины — соединения, выполняющие защитную роль в растении. Поэтому существенное увеличение с помощью изменения генома уровня салициловой кислоты и других соединений в ответ на проникновение фитопатогена может стать перспективным для получения устойчивых растительных организмов.

### 5.10.9. Устойчивость растений к абиотическим стрессам

Адаптация растений в природе и, следовательно, их способность к выживанию при неблагоприятных условиях среды обеспечиваются тремя способами. Во-первых, физиологические механизмы, позволяющие растениям избежать неблагоприятные воздействия (например, период покоя). Во-вторых, адаптация осуществляется благодаря морфологическим приспособлениям: тол-



стому слою кутикулы на листьях, уменьшению листовой поверхности, ее опушению, которые предотвращают излишнюю потерю влаги растениями. В-третьих, негативное влияние внешней среды может быть преодолено с помощью изменений метаболизма. Именно этот последний адаптационный механизм наиболее доступен для генно-инженерных исследований. Например, известно, что при водном стрессе у высших растений основным защитным механизмом, связанным с изменением метаболизма, является накопление в клетках пролина, глицинбеатина и других осмопротекторов.

Экспериментально было показано, что стрессовый ответ у бактерий и высших растений выражается сходно. И у растений, и у бактерий начинается усиленный синтез молекул осмопротекторов, механизм действия которых состоит в установлении осмотического баланса между цитоплазмой и окружающей средой, а также стабилизации белковых молекул. В бактериях биосинтез пролина хорошо изучен, известны гены, кодирующие ферменты этого процесса. Избирательная экспрессия генов осмопротекторов может привести к увеличению адаптационных качеств растения и, следовательно, к увеличению его продуктивности. Поэтому следующим шагом на пути создания устойчивых к стрессам растений было клонирование бактериальных генов, получение векторных конструкций на основе Ti-плазмиды и введение их в растения. Полученные трансгены синтезировали и накапливали пролин в 4—6 раз интенсивнее, чем обычные растения. Трансгенные побеги могли укореняться и расти при концентрации соли в среде 20 г/л (350 мМ).

У растений адаптация к низким температурам сопряжена с многочисленными физиологическими изменениями. При этом накапливаются растворимые вещества, понижающие осмотический потенциал клеток и уменьшающие вероятность образования крупных кристаллов льда. Кроме того, синтезируется большое количество белков с повышенным содержанием сульфгидрильных групп (-SH), которые обладают особо высокой способностью к гидратации, а гидратационная вода, как известно, практически не замерзает. Однако повышение устойчивости растений к замерзанию с помощью методов генной инженерии началось с изменения генома не растений, а бактерий. Исследователи Колорадского университета (США) выяснили, что повреждению растений при замерзании способствуют бактерии эпифитной (поверхностной) микрофлоры *Pseudomonas syringae* и *Erwinia herbicola*, белки которых служат центрами кристаллизации. Если обезвредить бактерии стрептомицином, то растения не замерзают при температуре -8 °С. Но стрептомицин дорог и вреден, поэтому выгоднее было изменить генетику данного штамма бактерий, вырезав из генома

определенный ген. Растения, инфицированные мутантным штаммом *P. syringae*, росли при отрицательной температуре. Однако оказалось, что бактерии мутантного штамма более живучи и способны вытеснить природный штамм, который, попадая в верхние слои атмосферы, способствует кристаллизации атмосферной влаги. Вероятно, уничтожение природного штамма могло бы привести к экологической катастрофе.

Следует отметить, что работы по генетической инженерии, возможности манипулирования генами растений представляют огромный интерес для фундаментальных исследований. Эти работы позволяют изучать основы молекулярной и клеточной биологии растительной клетки, глубинные механизмы процессов, происходящих в ней. Вместе с тем нельзя не задуматься о своевременности прикладного применения результатов генно-инженерных исследований.

## 5.11. ИММУНОБИОТЕХНОЛОГИЯ

Иммунобиотехнология — это отдельная, самостоятельная область современной биотехнологической промышленности, направленная на разработку иммунодиагностик, терапевтических приемов, методов и технологий производства лекарственных средств для защиты от воздействия различного рода биологических агентов.

Человек обладает высокоспециализированной и организованной системой защиты от микроорганизмов, вирусов, белков, нуклеиновых кислот, антибиотиков, пестицидов, обозначенных как антигены, которая способна вызвать специфический иммунный ответ с образованием антитела.

Различают две системы иммунитета. Защитная реакция организма в случае инфицирования бактериями осуществляется **В-системой иммунитета**. Её состав: костный мозг — основной источник **В-лимфоцитов** (от англ. *Bone marrow* — костный мозг) и основной набор различных классов антител, нейтрализующих бактерии и их токсины. В случае вирусной инфекции функционирует **Т-система иммунитета**, включающая тимус (вилочковая железа), различные популяции **Т-лимфоцитов**, антиген-распознающие рецепторы, находящиеся на поверхности этих клеток, группу регуляторных молекул — цитокинов (гликопротеинов, передающих сигналы от клетки к клетке).

Тесное взаимодействие компонентов обеих систем с участием фагоцитирующих клеток (иммунокомпетентные клетки — ИКК) обеспечивает иммунный ответ организма. Макрофаги поглощают, перерабатывают антиген в иммуногенной, доступной для Т- и В-лимфоцитов форме.

Т-клетки после распознавания антигена продуцируют цитокины, направляющие свое действие на В-клетки, которые далее приступают к выработке антител. Чужеродные и аномальные белки подвергаются протеолизу 26S иммунными протеасомами по АТФ-убиквитинзависимому пути с образованием антигенных олигопептидов длиной 8-11 аминокислот с С-концом, содержащим остатки гидрофобных аминокислот. Эти белки называют *эпитопами*. Они соединяются в цитоплазме с белками-транспортерами и переносятся в эндоплазматический ретикулум, где связываются с молекулами *главного комплекса гистосовместимости I* (ГКГ I) и выносятся вместе с ними на поверхность клетки в составе трансмембранных пузырьков. Данная структура является сигналом для Т-лимфоцитов (Т-киллеров) для уничтожения дефектной клетки.

Иммунный ответ — сложный процесс межклеточного взаимодействия лимфоидных клеток разных типов с участием специфических гормонов, в результате чего В-клетки синтезируют специфические антитела против определенного антигена. Функция каждого клеточного типа в антителопродукции строго определена: макрофаги поглощают, перерабатывают и экспрессируют антиген в иммуногенной, доступной для Т- и В-лимфоцитов форме. Т-клетки (Т-хелперы) после распознавания антигена продуцируют цитокины, помогающие В-клеткам синтезировать антитела. В ходе эволюции молекулы антител превратились в структуры, обладающие необычной конформацией и динамическими свойствами (рис. 5.21).

Все *антитела* имеют общий тип пространственной организации пептидных цепей. Прототипом структуры всех антител можно считать иммуноглобулин G (IgG). Молекула IgG состоит из четырех цепей — двух тяжелых (H) ( $M_r = 440$  ак) и двух легких (L) цепей (220 ак), удерживаемых вместе посредством сильных межмолекулярных взаимодействий и дисульфидных связей. Для этой структуры характерны доменная организация молекулы и выполнение специфических функций отдельными доменами: Fab (антигенсвязывающие области), Fc (константные области), CH2, CH3 (центры связывания комплемента). Все четыре цепи соединены между собой и достаточно подвижны.

Существует 5 разных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM в соответствии с типом тяжелых цепей  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$ . Разные H-цепи придают «хвостовым» областям антител различную конформацию и определяют характерные свойства каждого класса антител (рис. 5.22).

Система комплемента (СК) дополняет (комплементирует) и усиливает действие антител. СК-система состоит примерно из 20 взаимосвязанных компонентов — белков с  $M_r$  от 24 до 400 кДа. Они образуются в печени и циркулируют в крови и тканевой жидкости. Активация СК-комплексами образований «антиген—анти-

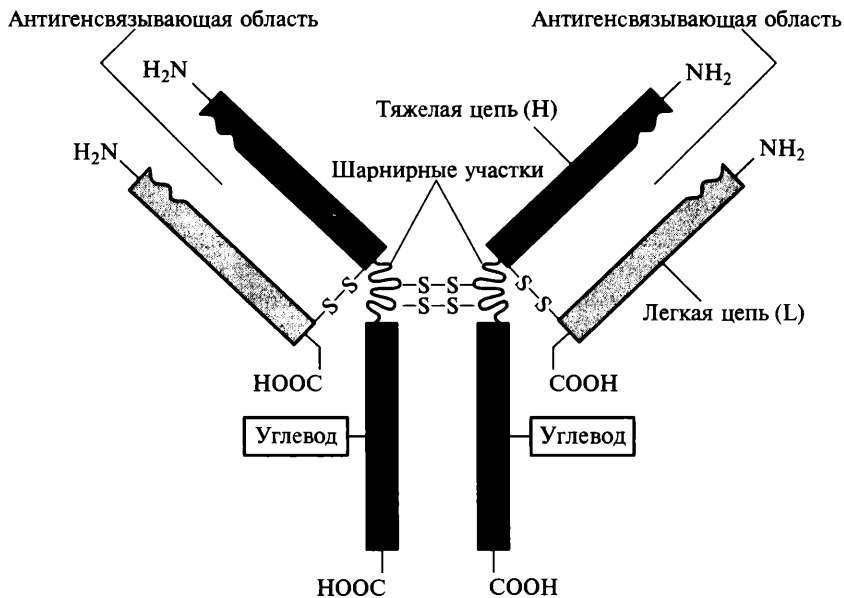


Рис. 5.21. Схема строения типичной молекулы антитела

тело» происходит за счет каскада протеолитических реакций, вызывающих гибель микроорганизмов и повышение способности фагоцитирующих клеток связывать и разрушать микроорганизмы.

Для антитела характерна необыкновенная, уникальная специфичность. Каждое антитело узнает только свой антиген (чужеродные макромолекулярные вещества — белки или полисахариды). Известно, что иммунизация низкомолекулярными веществами (например, лекарственными препаратами) не может вызывать иммунный ответ, поэтому для образования антител необходимо предварительно их ковалентно связать с иммуногенным высокомолекулярным носителем. Сначала в лекарственное вещество для увеличения его функциональной активности вводят определенные функциональные группы, которые взаимодействуют с соответствующими функциональными группами биополимера, образуя так называемый *синтетический конъюгированный антиген*. При иммунизации животного таким антигеном образуются поликлональные антитела, специфичные как к самому антигену, так и к антигенным детерминантам лекарственного препарата.

Установлено, что антитело, специфичное к своему антигену, узнает только одну его *детерминантную группу* (эпитоп). Каждая такая детерминантная группа состоит из небольшого количества аминокислот, обычно из 6-8, образующих пространственную структуру, характерную для данного антигена (белка). В зависи-

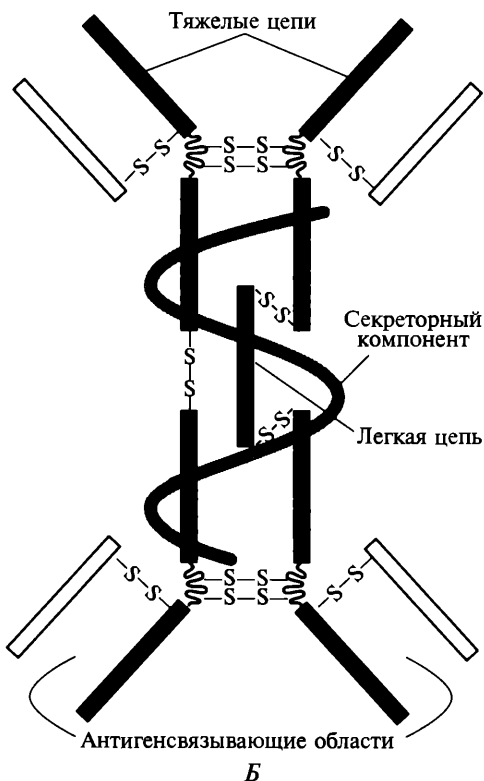
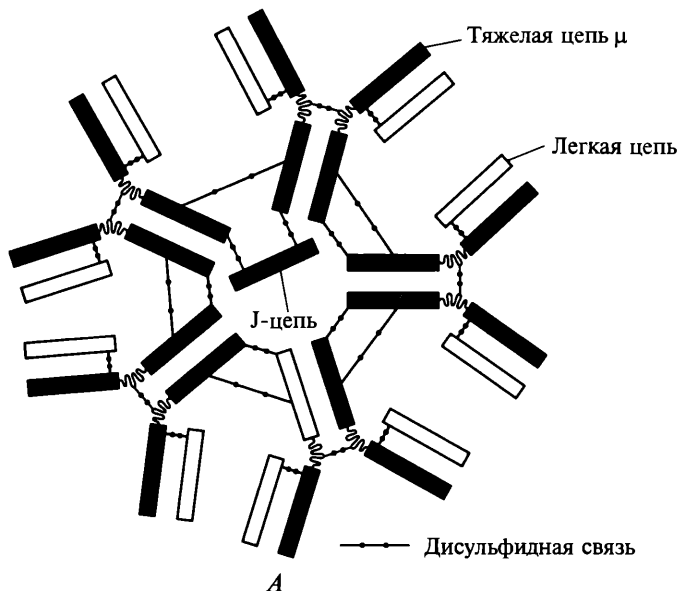


Рис. 5.22. Строение пентамерной молекулы IgM (*A*) и димерной молекулы IgA (*B*):

*A* — пять субъединиц, соединенные дисульфидными связями. Единственная J-цепь (мол. масса около 15 000 Да) связана с двумя тяжелыми цепями и замыкается в кольцевую структуру; *B* — комплекс содержит J-цепь и добавочную полипептидную цепь, называемую секретным компонентом (мол. массой 70 000 Да), в дополнение к двум мономерам IgA

мости от размера молекулы белка в нем содержится несколько (от 5 до 15) детерминантных групп, у полисахаридов — от 3 до 6 остатков моносахаридов, что обуславливает образование к одному данному белку (или полисахариду) целого семейства анти-тел с разной специфичностью (табл. 5.2). Даже к одному эпитопу могут образовываться различные антитела, в результате чего в сы-воротке крови иммунизированных животных появляется большое и уникальное по составу *семейство антител* с абсолютной спе-цифичностью в распознавании этого антигена. Такие семейства антител давно применяют для нейтрализации бактериальных ток-синов (дифтерийного, столбнячного, ботулизма), змеиных ядов (кобры, гадюки), вирусов, попадающих в кровь, для иденти-фикации индивидуальных белков в клетке или тканевых экстрактах.

Однако при лечении многих заболеваний, а также при транс-плантации органов и тканей целесообразно использовать не по-ликомпонентные смеси антител, образующиеся в организме в ответ на действие антигена, а отдельные составляющие их ком-поненты, специфичные к одной определенной детерминантной группе. Такие антигены, специфичные лишь к одной определен-ной детерминантной группе антигена, однородные по структуре и составу и производимые в неограниченном количестве приня-то называть *моноклональными антителами* (МКА).

**Получение моноклональных антител.** Несмотря на суще-ственные достижения в области применения моноклональных антител в диагностике и терапии различных заболеваний, полу-чение этих антител связано с разного рода трудностями, что ог-раничивает их использование. Для получения антител обычно используют мышей, морских свинок, кроликов, кур, овец, коз, лошадей, которым делают инъекции антигена. В присутствии сти-муляторов иммунного ответа в крови накапливаются специфиче-ские антитела. Антитела выделяют с помощью сульфата аммония, спирта или полиэтиленгликоля. Очистку антител от примесей белков осуществляют путем ионно-обменной и аффинной хрома-тографии на соответствующих иммуносорбентах.

Для организации масштабного биотехнологического производ-ства моноклональных антител (МКА) в настоящее время исполь-зуют *метод гибридной технологии*.

Важнейшая задача метода гибридной технологии — полу-чение однородных антител со строгой специфичностью дей-ствия. Известно, что путем иммунизации животного (введения определенного антигена или только одной детерминанты) этого сделать нельзя ввиду образования большого количества генети-чески однородных семейств антителобразующих клеток АОК-клонов, каждый из которых синтезирует только один вариант ан-тител к его детерминантам. Таких клонов очень много, что обус-

Основные классы антител и их свойства

Класс и тип тяжелых цепей	Концентрация в сыворотке, г	Локализация в тканях	Антиген-связывающие центры	Период жизни, дни	Особенности строения и функций	Биологическая активность
G ( $\gamma$ )	12	Плазма крови, тканевая жидкость	2	2,1	Основной класс иммуноглобулинов. Связывается с макрофагами и нейтрофилами	Единственный среди Ig проходит через плаценту к плоду. Способен связываться с тканями
M ( $\mu$ )	1,1—0,9	Плазма крови, лимфа	10	5,1	Основной класс, выделяемый на ранних стадиях первичного иммунного ответа. Пентамер. Содержит еще одну полимерную цепь — J-цепь	Обнаружен у плода, что указывает на внутриутробную инфекцию
A ( $\alpha$ )	2	Слизистые оболочки, секреторные жидкости	4	5,8	Представлен или 4-цепочечными мономерами или димерами с J- и СК-цепями	Обнаружен в слюне уже на 6-8-й неделе жизни
D ( $\delta$ )	0,3	Плазма крови	2	2,8	Отсутствует в крови новорожденных. Связь с хронически присутствующими в крови антигенами	Способен образовывать пары «антиген — антитело» с В-лимфоцитами
E ( $\epsilon$ )	0,0025	Бронхи, лимфоузлы, слизистые оболочки пищеварительной системы	2	2,3	Присоединение к антигену приводит к выделению клетками гистамина и серотонина	Обуславливает аллергические реакции, в частности, при заболеваниях: астма, крапивница, сенная лихорадка

довливает большое разнообразие антител, индуцируемых одним антигеном. Если определенную линию В-лимфоцитов можно было бы выделить и вырастить в культуре тканей (в пробирке) *in vitro*, то полученный клон продуцировал бы только один тип антител — МКА. Но это сделать невозможно, так как нормальные клетки, будучи высаженными в культуру, вскоре погибают («смертность клетки»).

Метод гибридной технологии, используемый для получения МКА, предусматривает получение гибридных клеток за счет слияния соматических клеток. Разрушение оболочек клеток и их слияние осуществляются при использовании вируса или полиэтиленгликоля. Из разнородных клеток после такой обработки можно получить двоядерные гибриды, сохранившие способность к клеточному делению. В процессе клеточного деления хромосомы обоих ядер перемешивались и образовывали общее ядро. В результате возникал потомок двух соматических клеток или гибридома. Однако гибридомы нормальных соматических клеток, синтезирующих антитела со строго определенной специфичностью, также не могут быть использованы для получения МКА, так как после пересаживания в культуру они вскоре погибают.

Данная проблема была решена в результате использования опухолевых клеток человека — *плазмоцитом*, вырабатывающих иммуноглобулины, чрезвычайно похожие по структуре на антитела, продуцируемые нормальными клетками. Плазмоцитомные антитела также образовывали смесь различных гибридных комбинаций с антителами крови, среди которых обнаруживались и специфически реагирующие пары «антиген—антитело».

Плазмоцитомы обладают рядом особенностей, позволяющих их использовать для получения МКА заданной специфичности. Плазмоцитомы возникают из одной (мутантной) генетически измененной клетки, вследствие чего она зарождается и развивается как *клон* иммуноглобулинообразующих клеток со строгой специфичностью действия.

Плазмоцитомы возникают непредсказуемо, спонтанно, и можно их легко индуцировать и получить таким образом неограниченно растущий клон клеток, продуцирующих иммуноглобулины, нередко обладающие специфичностью МКА.

Плазмоцитомы, как опухоль, бессмертна в отличие от нормальных предшественников, что позволяет культивировать ее в пробирке и пересаживать многократно от одного животного другому. В силу автономии организм-хозяин не способен прекратить безудержный рост опухоли. Плазмоцитомы сохраняют свойства и функции плазматической клетки, синтезирующей антитела, из которой она произошла.

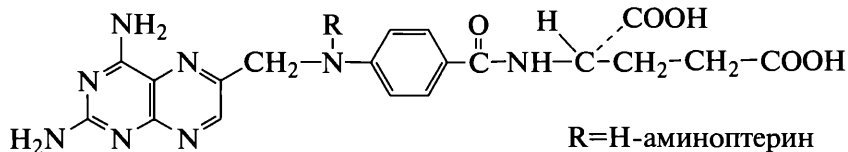


Двумя исследователями Г. Кёлером (немецкий иммунолог) и Ц. Мильштейном (английский биолог) был разработан *метод получения гибрида* нормальной антителообразующей плазматической клетки и опухолевой клетки плазмоцитомы. Полученная *гибридома* от нормальной клетки унаследовала способность к синтезу антител, а от опухолевой — бессмертие и способность к неограниченному росту.

Отделение гибридомы с требуемой специфичностью от присутствующих в системе отдельных неслившихся клеток, а также гибридов иного состава и специфичности осуществляют по специальной схеме, включающей отбор клеток в селективной среде. Гибридизацию клеток проводят с применением особого мутанта мышинной плазмоцитомы, рост которого можно контролировать составом питательной среды, влияющим на направленность синтеза предшественников нуклеиновых кислот (нуклеотидов). Основной путь биосинтеза нуклеиновых кислот (из нуклеотидов) блокируется добавлением противоопухолевого препарата — *аминоптерина*. Однако, клетки могут не погибнуть при наличии в среде аминоптерина, поскольку они способны синтезировать нуклеотиды и нуклеиновые кислоты по так называемому резервному пути за счет реутилизации продуктов распада ранее синтезированных молекул — *гипоксантина* и *тимидина*. Добавление в питательную среду этих соединений снижает токсический эффект аминоптерина.

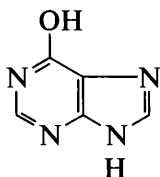
Для селекции гибридом получают мутант плазмоцитомы, не способный пользоваться резервным путем и погибающий в среде, которая содержит аминоптерин (А) и токсичные аналоги гипоксантина (Г) и тимидина (Т). Выживают лишь редкие мутанты, не способные усваивать токсичные Г и Т и тем самым утратившие способность к синтезу собственных иммуноглобулинов (см. схему, с. 183).

Получение гибридом сводится к определенным операциям (рис. 5.23). Гибридомы получают путем смешивания взвеси антителообразующих клеток (АОК) и клеток мутантной плазмоцитомы с добавлением полиэтиленгликоля. После инкубации, необходимой для слияния клеток, они отмываются от полиэтиленгликоля и помещаются в среду, содержащую А, Г и Т (ГАТ-среда). В среде находятся оставшиеся свободными гибриды АОК × АОК, ПК × ПК и АОК × ПК. После недолгого культивирования одиночные АОК и гибриды АОК × АОК погибают, так как нормальные клетки смертны в культуре. Плазмоцитомные клетки и их гибриды погибают в присутствии аминоптерина, который блокирует основной путь синтеза нуклеотидов, а токсичные Г и Т «не включают» резервный путь. Выживают только гибриды АОК × ПК, так как они сохраняют способность к антителообразованию по основному пути, а бессмертие от плазмоцитомы.

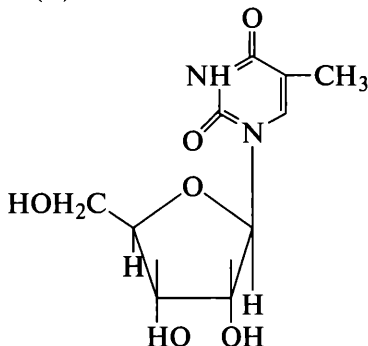


Противоопухолевый препарат  
аминоптерин (А)

R=H-аминоптерин  
R=CH<sub>3</sub>-аметоптерин  
(метатрексат)



Гипоксантин (Г)



Тимидин (Т)

Выжившие в ГАТ-среде клетки гибридом рассеиваются в специальные пластиковые планшеты с 96 лунками вместимостью по 0,2 см<sup>3</sup>. В каждую лунку помещается около 10 гибридомных клеток, в присутствии некоторых клеток способствующих их росту. Обнаружение антител нужной специфичности проводят с помощью специальных микрометодов. Клетки с нужными антителами клонируют и повторно рассеивают по таким же лункам (из расчета одна клетка на лунку), вновь культивируют и анализируют на присутствие МКА. Полученные клоны можно заморозить при -70 °С и хранить длительное время. При их культивировании или прививке животным можно накапливать моноклональные антитела в культурной среде в больших количествах. МКА можно считать чистыми химическими реактивами вследствие однородности их физико-химических свойств.

**Применение моноклональных антител.** МКА в силу своей высочайшей специфичности, стандартности и технологичности получения вытесняют и заменяют обычные поликлональные иммунные сыворотки, применяемые для определения биологически активных соединений. Гибридомную технологию с успехом применяют в аналитических целях. С помощью гибридом можно получить огромное количество антител к уникальному антигену (или к одному из его эпитопов), вывести линию одного клона, в то время как в крови иммунизированного животного среди множе-

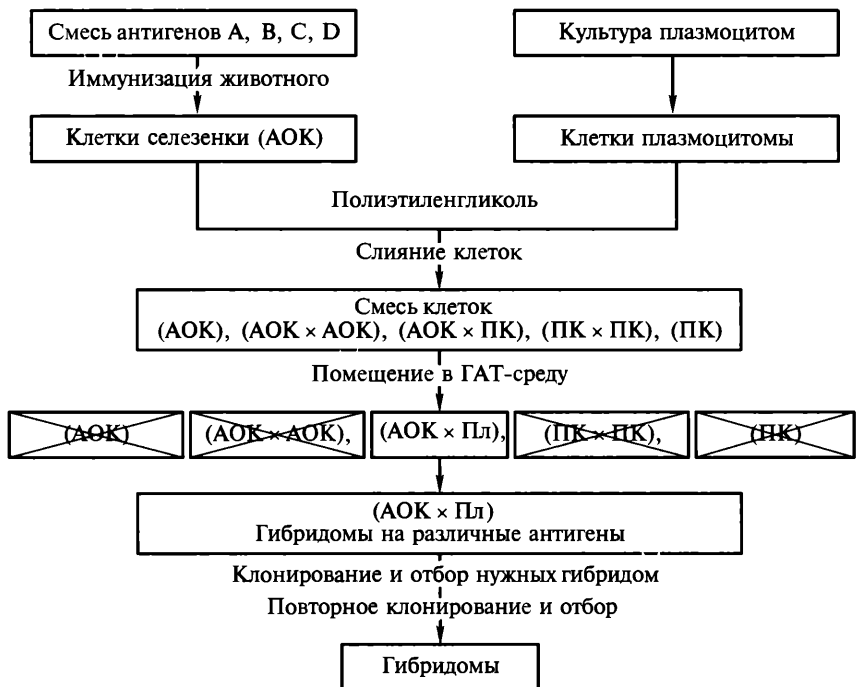


Рис. 5.23. Схема получения гибридом:

АОК — антителообразующие клетки; ПК — клетки плазмоцитомы, образующие Ig за счет резервного пути; Пл — клетки плазмоцитомы, не растущие в ГАТ-среде и лишенные способности продуцировать Ig; АОК x Пл — гибридомы со способностью к специфическому образованию антител и «бессмертию»; ГАТ — среда, содержащая аминоптерин (А), токсичные гипоксантин (Г) и тимидин (Т) и моноклональные антитела

ства других антител он не может проявиться ввиду чисто количественных соотношений.

Благодаря гибриdomам разработаны новые методы диагностики многих заболеваний, в том числе онкологических. С их помощью можно обнаружить антигены, характерные для злокачественных опухолей определенных тканей, получить к ним моноклональные антитела и использовать их для диагностики и тестирования опухолей. Во всем мире ведутся интенсивные исследования по использованию МКА в качестве специфических переносчиков токсических веществ в опухолевые клетки. В опухоль и ее метастазы с помощью МКА добавляют радиоактивные вещества, позволяющие обнаружить локализацию небольших узелков опухоли по накоплению в них радиоактивности. МКА с успехом применяют для диагностики многих инфекционных заболеваний,

стандартизации определения групп крови, идентификации специализированных клеток, например таких, как нейроны.

Очень важно использование МКА для изучения клеточных *мембран*. Мембранные белки, присутствующие в клетках в малых количествах, трудно выделить в чистом виде и измерить их биологическую активность. Были получены гибридомы, продуцирующие антитела против тимоцитов крысы, а затем изолированы ряд клонов с активностью антител, специфичных для отдельных антигенов (белков) клеточной поверхности.

Использование МКА позволяет эффективно осуществлять лекарственный мониторинг, разработку иммунодиагностических тест-систем, открывает перспективу получения высокоспецифичных вакцин и сывороток против определенных вирусных штаммов и паразитов.

**БЕЛКОВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ**

Получение белков методами генетической инженерии остается важнейшей задачей биотехнологии третьего тысячелетия. К настоящему времени методами генетической инженерии в мире получено более 100 различных протеинов. Однако особенности природных свойств многих из них (нестабильность, ограниченные пределы субстратной специфичности, потребность в кофакторе, биodeградируемость, наличие механизмов регуляции активности и др.) ограничивают возможности промышленного применения получаемых белков. Необходимость преодоления указанных ограничений привела к возникновению в недрах современной биотехнологии такого перспективного направления, как белковая инженерия.

Цель белковой инженерии состоит в конструировании *in vitro* новых белков с заданными свойствами. Изучение направленного изменения свойств белков имеет помимо прикладного принципиальное значение для понимания на молекулярном уровне структурно-функциональных отношений в биополимерах, ибо они составляют сущность жизненных процессов.

Наиболее реальным способом создания нового белка считается внесение специфических изменений в клонированный ген известного белка, что обеспечивает получение определенных изменений в первичной структуре последнего. Методической основой для введения в состав нуклеотидных последовательностей клонированной ДНК заранее запланированных изменений является олигонуклеотид-направленный (сайт-специфический) мутагенез.

Направленным, или сайт-специфическим, мутагенезом называется совокупность методов получения мутаций, основанных на использовании генно-инженерных подходов.

Для осуществления направленного мутагенеза клонированных генов используют два типа связанных друг с другом экспериментальных подходов: рациональный дизайн (*rational design*) и направленную эволюцию.

*Стратегия получения нового белка*, согласно первому подходу, базируется на теоретических представлениях о будущей пространственной структуре белка. Используя принципы биоинформ-

матики и методы компьютерного моделирования, строят трехмерную модель протеина, на основе которой выводят первичную структуру полипептидной цепи желаемого белка. В этих работах часто применяют известные аминокислотные последовательности, совершенствование биологических функций которых проводят методами направленного мутагенеза. Успех экспериментов в области рационального дизайна ограничивается в настоящее время неполнотой наших знаний о фолдинге белков и недостаточностью мощностей современной компьютерной техники.

При осуществлении *ускоренной эволюции белков* создают большие (репрезентативные) библиотеки генов, совокупность нуклеотидных последовательностей которых перекрывает все пространство или определенную часть генома организма. После процедуры первоначального клонирования генов получают набор случайных аминокислотных последовательностей, среди которых отбирают варианты, близкие по биологической активности. Далее на базе отобранных вариантов аминокислотных последовательностей с помощью методов молекулярного клонирования генов и направленного мутагенеза конструируют новые наборы мутантных белков, которые подвергаются следующему раунду скрининга и т. д. Для сокращения объема экспериментальной работы в процессе реализации данного экспериментального подхода, как и в первом случае, обычно используют известную аминокислотную последовательность.

Направленный мутагенез позволяет получать мутации любого размера — единичные или множественные замены, делеции, вставки.

## 6.1. НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ

Простейшим способом внесения точковых мутаций в клонированный ген является *олигонуклеотиднаправленный мутагенез* с использованием ДНК бактерий М13. Ген-мишень, кодирующий измененную аминокислотную последовательность белка, обычно встраивают в двухцепочечную форму вектора на основе фага М13. С этой целью одноцепочечную форму вектора [(+)-цепь ДНК] гибридизуют с синтетическим олигонуклеотидным праймером, содержащим в нужном кодоне один некомплементарный нуклеотид (рис. 6.1). Например, триплету АТТ в составе ДНК фага (кодирует изолейцин) будет соответствовать триплет ГАА в составе олигонуклеотида. Олигонуклеотид используется в качестве праймера, 3'-конец которого служит для инициации, а ДНК плюс-цепи фага М13 — матрицей для синтеза второй цепи, комплементарной матричной цепи по всей длине, за исключением области

мутации. Репликацию осуществляют с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E.coli* (для предотвращения выщепления праймера в конце синтеза) при наличии в среде четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, а соединение концов обеспечивают посредством использования ДНК-лигазы фага Т4. Полученные двухцепочечные молекулы, содержащие некомплементарные нуклеотиды, клонируют в клетках *E.coli*. В соответствии с полуконсервативным механизмом репликации одна половина популяции фагового потомства содержит ДНК дикого типа, а другая — мутантную ДНК с нуклеотидной заменой. Мутагенный ген вырезают и клонируют в экспрессирующем векторе. В полученном таким способом мутантном белке остаток изолейцина будет заменен на остаток лейцина.

Недостатком олигонуклеотиднаправленного мутагенеза с использованием фага М13 является его трудоемкость. В качестве альтернативы системе с использованием фага М13 разработаны подходы с применением плазмидных ДНК, в которые встраивают двухцепочечные мутантные гены-мишени.

В настоящее время разработаны различные методы образования делеций практически любого размера. Так, эффективный метод создания делеций с использованием экзонуклеазы Bal31 (из *Alteromonas espejina*) позволяет последовательно удалять нуклеотиды с 3' и 5'-концов сайтов рестрикции. Для этого целевой ген, клонированный в плазмиде, расщепляют по уникальному сайту рестрикции. Обра-

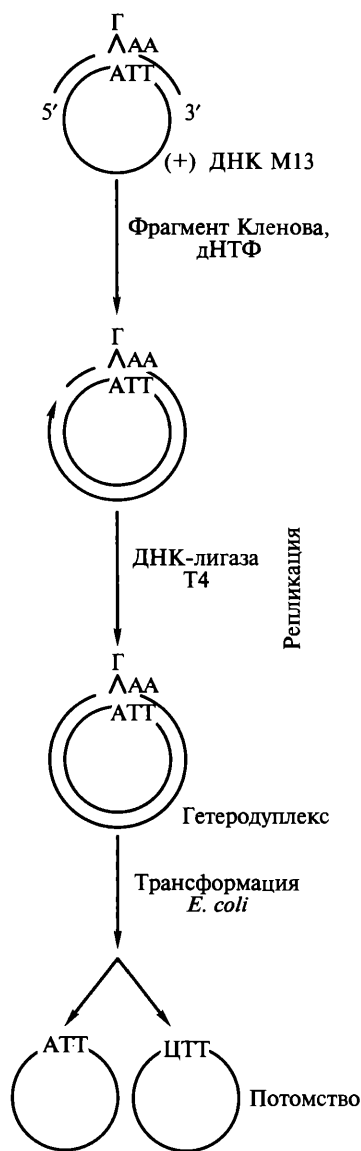


Рис. 6.1. Получение точковой мутации в клонированном гене методом олигонуклеотиднаправленного мутагенеза с использованием бактериофага М13 (пояснения см. в тексте)

зовавшиеся линейные молекулы ДНК инкубируют в присутствии экзонуклеазы Bal31. Фермент отщепляет нуклеотиды с обоих концов молекулы прямо пропорционально времени инкубации ее с экзонуклеазой. В результате возникает набор полинуклеотидных фрагментов разной длины, несущий делеции разного размера по обе стороны сайта рестрикции. В полученные фрагменты вводят уникальные сайты рестрикции, а затем каждый из фрагментов клонируют в реципиентных клетках (рис. 6.2).

Достижения в области белковой инженерии напрямую связаны с применением прогрессивной технологии ПЦР-амплификации. Сочетание сайт-специфического мутагенеза с полимеразной цепной реакцией оказалось незаменимым подходом к простому и быстрому получению больших количеств мутантных генов. Один из вариантов введения сайт-специфических мутаций в амплифицируемый фрагмент ДНК состоит в применении наряду с внешними праймерами (a + d) внутренних праймеров (b + c), имеющих измененную нуклеотидную последовательность и комплементарных друг другу (рис. 6.3).

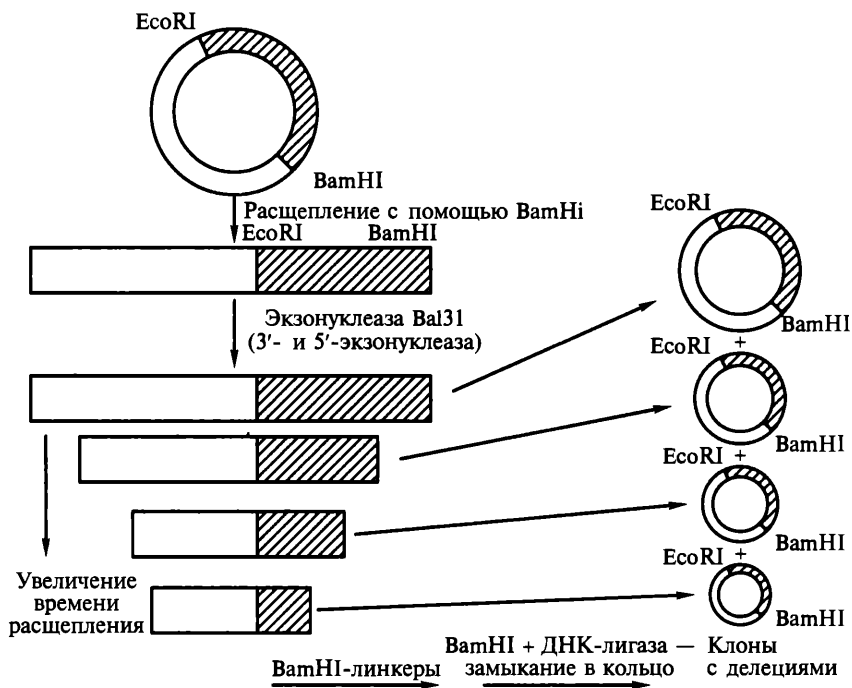


Рис. 6.2. Получение делеции с помощью нуклеазы Bal31 (Л.И.Патрушев, 2004)



Ген-мишень встраивают в плазмиду между двумя уникальными сайтами рестрикции и проводят амплификацию его левого и правого перекрывающихся между собой фрагментов с помощью нескольких раундов ПЦР. В первом раунде ПЦР в отдельных про-

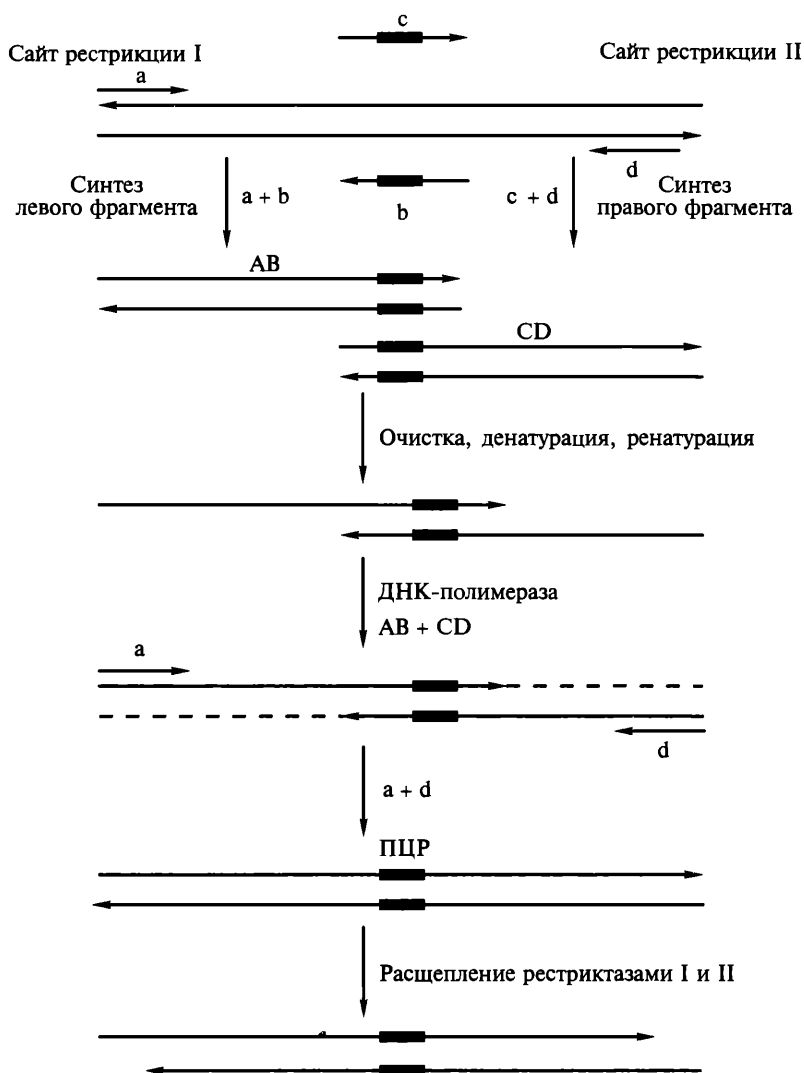


Рис. 6.3 Применение олигонуклеотиднаправленного мутагенеза с использованием ПЦР для получения мутаций:

AB и CD – фрагменты ДНК. Мутационный сайт обозначен темным прямоугольником (пояснения см. в тексте)

бирках амплифицируют левый (праймеры  $a + b$ ) и правый (праймеры  $c + d$ ) фрагменты гена, являющегося мишенью мутаций. В результате образуются два перекрывающихся фрагмента. Продукты ПЦР-амплификации очищают от праймеров, объединяют в эквивалентных количествах, а затем подвергают тепловой денатурации. В итоге образуется некоторое количество частично двухцепочечных молекул ДНК, спаренных в области гена-мишени. Их достраивают до полностью двухцепочечных молекул с помощью ДНК-полимеразы (отмечены пунктирными линиями на рисунке), и образовавшаяся молекула ДНК, содержащая требуемую мутацию, служит матрицей в следующем раунде ПЦР-амплификации с парой праймеров ( $a + d$ ), комплементарных противоположным концам молекулы. Амплифицированные молекулы обрабатывают двумя рестриктазами (I и II), сайты расщепления которых находятся на концах фрагмента, и клонируют в соответствующем векторе. Этот подход позволяет получить измененные гены с случайными мутациями.

## 6.2. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ БЕЛКОВ

Направленное конструирование модифицированных белков — один из наиболее эффективных путей создания протеинов, удовлетворяющих требованиям высокоспециализированных жестких процессов, протекающих *in vitro*. В первую очередь методы белковой инженерии позволяют повысить стабильность белков, их устойчивость к воздействию повышенных температур, окисляющих агентов, органических растворителей, ингибиторов, протеаз. Для таких белков, как ферменты, важными в практическом отношении свойствами, которые желательно улучшить, являются кинетические параметры и субстратная специфичность. В табл. 6.1 приведены примеры использования сайт-направленного мутагенеза для изменения конкретных свойств ряда белков.

Так, к значительному возрастанию стабильности белковой молекулы приводит возникновение в ней дополнительных дисульфидных связей. В серии экспериментов с помощью олигонуклеотиднаправленного мутагенеза были сконструированы шесть вариантов лизоцима фага Т4 с новыми внутримолекулярными дисульфидными связями. С этой целью два, четыре или шесть определенных аминокислотных остатков в полипептидной цепи белка были заменены на остатки цистеина, в результате чего стало возможным образование в его молекуле одной, двух или трех S-S-мостиков соответственно. Мутантные белки клонировали в клетках *E.coli*, рекомбинантные белки очищали и устанавливали

их термостабильность. Результаты эксперимента показали, что с увеличением числа дисульфидных связей в молекуле фермента его термостабильность закономерно возрастает. Однако вариант, обладающий тремя S-S-мостиками и характеризующийся наибольшей термостабильностью, полностью терял энзиматическую активность. Этот эффект объясняется тем, что некоторые дисульфидные связи препятствуют нормальному функционированию белка в результате нарушения пространственной структуры его молекулы.

Другой аспект исследования в области белковой инженерии ферментов связан с направленными изменениями их субстратной специфичности путем замены отдельных аминокислотных остатков, участвующих в формировании активных центров энзимов. Такой подход был использован группой И. Сигала, сотрудники которой заменили остаток сер70 в активном центре  $\beta$ -лактамазы на остаток цистеина. В результате данной замены способность расщепления субстрата — пенициллина — мутантным энзимом уменьшалась в 50—100 раз. Одновременно с этим мутантная  $\beta$ -лактамаза была более активна к цефалоспорином — представителям  $\beta$ -лактамных антибиотиков третьего поколения.

Названные исследования позволяют уточнить функциональную значимость отдельных аминокислот в белках, механизмах действия конкретных ферментов и молекулярных основах регуляции их активности.

Особый интерес представляют исследования в области белковой инженерии, направленные на снижение нежелательных для человека и животных свойств генно-инженерных природных биорегуляторов — интерлейкинов, интерферонов, цитокинов, гормонов. Большую заинтересованность в практических возможностях белковой инженерии проявляют фирмы, производящие ферментные препараты для моющих и косметических средств, кожевенной, текстильной и пищевой промышленности.

Методами белковой инженерии конструируют белки, соединяющие в себе различные полезные функции (так называемые гибридные, слитные или составные белки). Гибридными белками называют полипептиды, искусственно составленные из природных доменов разного происхождения. Это возможно благодаря модульному принципу строения белков. Домены (модули), выполняющие сходные биологические функции у разнообразных по физико-химическим свойствам белков разных организмов, построены однотипно. Функциональные домены полифункциональных белков складываются и действуют независимо друг от друга.

Гибридные белки получают с помощью метода ПЦР. С этой целью синтезируют праймеры, 3'-концы которых комплементарны границам переносимого домена гена А, а 5'-концы замещаемого

### Использование сайт-направленного мутагенеза для создания модифицированных белков

Название белка	Изменения, внесенные в молекулу белка	Изменения в свойствах мутированного белка
Активатор тканевого плазминогена человека	1. Три-103 → асп. 2. Лиз-гли-арг-арг(296-299) → → ала-ала-ала-ала. 3. Асп117 → гли	1. Увеличение стабильности. 2. Повышение сродства к фибрину. 3. Сохранение фибринолитической активности
Интерлейкин-2 человека	Цис17 → сер	Повышение стабильности и биологической активности
β-Интерферон человека	Цис 59, 105, 125 → сер	Повышение противовирусной активности, снижение способности к агрегации
γ-Интерферон человека	1. Арг129 → гли, лиз130 → сер. 2. Удаление 10 аминокислотных остатков с С-конца. 3. Удаление 14 аминокислотных остатков с С-конца	1. Возрастание устойчивости к протеолизу. 2. Повышение биологической активности. 3. Снижение биологической активности
α-Фактор некроза опухолей	Арг32 → лиз	Уменьшение токсичности
Ксиланаза <i>B. circulans</i>	Введение новой S-S связи между N- и С-концевыми фрагментами	Повышение каталитической активности в два раза, возрастание термостабильности в четыре раза

Лизоцим фага Т4	1. Введение трех новых S-S-связей. 2. Введение одной новой S-S-связи	1. Возрастание термостабильности, полная потеря энзиматической активности. 2. Возрастание термостабильности и ферментативной активности
Субтилизин <i>B. amyloliquefaciens</i>	Выщепление $\text{Ca}^{2+}$ -связывающего домена	Потеря потребности в $\text{Ca}^{2+}$ , повышение стабильности
Тирозин-тРНК-сингтаза <i>B. stearothermophilus</i>	1. Тре51 → про. 2. Тре51 → ала	1. Увеличение сродства к АТФ в 100 раз. 2. Уменьшение сродства к АТФ в два раза. Увеличение каталитической активности в обоих случаях (1, 2)
Триозофосфатизомераза <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1. Асн14 → тре. 2. Асн15 → асп	а. Повышение термостабильности. б. Понижение термостабильности
$\beta$ -Лактамаза	Сер70 → цис	Уменьшение в 50 — 100 раз скорости расщепления пенициллина
Белковый ингибитор субтилизина <i>Streptomyces lividans</i>	1. Мет73 → лиз (арг). 2. Мет73 → тир (три)	Изменение субстратной специфичности белка: появление способности ингибировать трипсин (1), $\alpha$ -трипсиноген (2)
Трипсин млекопитающих	Гли226 → ала	Уменьшение в 100 раз способности гидролизовать аргсодержащие субстраты
Цитохром P <sub>450cch</sub> мышц	Фен209 → лей	Появление способности к 15 $\alpha$ -гидроксилрованию стероидов и потеря способности использовать кумарин

домена гена В (рис. 6.4). Ген В клонируют в одностороннем векторе [(+)-нить] и гибридизуют с одной из нитей дуплекса, образующегося в результате амплификации переносимого домен-кодирующего участка. Нить дуплекса служит праймером для копирования (+)-нити вектора. В результате возникает комплементарная полинуклеотидная цепочка, ген В которой будет содержать участок, кодирующий домен гена А.

Получение гибридных белков — необходимая часть экспериментов в области генетической инженерии, при осуществлении

которой часто требуется оценить скорость биосинтеза целевых белков, проследить за их перемещением и концентрацией. Для этого соединяют фрагменты ДНК, содержащие открытые рамки считывания, с генами белков — репортеров ( $\beta$ -галактозидазы, люциферазы, хлорамфеникол-ацетилтрансферазы, зеленого флуоресцентного белка и др.).

В 80-е годы XX в. получены гибридные белки, объединяющие в одной полипептидной цепи два различных белка — человеческий  $\gamma$ -интерферон и интерлейкин-2 — и сохранившие в ней обе биологические активности. Шведским исследователям удалось создать гибридный белок, содержащий тканевый активатор плазминогена и фрагмент урокиназы, при этом время полужизни каждого из них значительно возросло. Полученные результаты поставили вопрос о возможности получения лекарственных препаратов комбинированного действия.

Идея слияния генов разных белков оказалось плодотворной для конструирования искусственных цитотоксинов направленного действия (рецепторопосредованных токсинов). Большинство природных токсинов белковой природы включают не менее двух доменов. Один из них обладает действенным

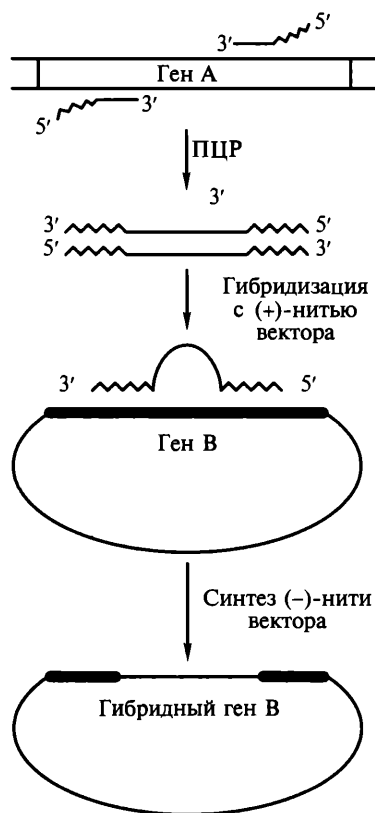


Рис. 6.4. Конструирование гибридного белка с помощью метода ПЦР (В. Н. Рыбчин, 2002). Волнистыми линиями обозначены нуклеотидные последовательности в праймерах, комплементарные концам замещающего домена в гене В

эффектом, а другой (лиганд) распознает рецептор на поверхности клетки — мишени, помогая токсину проникнуть в нее. При замене второго домена на какой-нибудь другой пептидный лиганд токсин приобретает другую специфичность действия. Так, соединение в пределах одной полипептидной цепи домена дифтерийного токсина и фактора роста клеток или меланоцитостимулирующего гормона  $\alpha$  человека позволило создать лекарственный препарат направленной доставки токсина к опухолевым клеткам.

В процессе дальнейшего усовершенствования системы адресной доставки цитотоксических пептидов были сконструированы гибридные белки на основе экзотоксина A *Pseudomonas aeruginosa*. В качестве адресной части (лиганда) в гибридном токсине использовали фрагмент полипептидной цепи CD4 — гликопротеина поверхности Т-клеток. CD4 является рецептором ВИЧ и в процессе вирусной инфекции взаимодействует с поверхностным гликопротеином ретровируса gp120. Созданные молекулы гибридного токсина позволяют избирательно поражать Т-клетки, инфицированные ВИЧ и несущие на своей поверхности белок gp120. Высокоспецифичными токсичными средствами по отношению к лейкозным клеткам человека оказались также гибридные токсины, содержащие переменные домены моноклональных антител к части (p55) рецептора интерлейкина-2 человека.

Таким образом, несмотря на короткий срок развития, итоги и перспективы белковой инженерии настолько впечатляющи, что по праву позволяют считать ее точкой роста современной науки и производства.

## ОСНОВЫ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Клеточная инженерия — одно из наиболее важных направлений в биотехнологии. Она основана на использовании принципиально нового объекта — изолированной культуры клеток или тканей эукариотических организмов, а также на тотипотентности — уникальном свойстве растительных клеток. Применение этого объекта раскрыло большие возможности в решении глобальных теоретических и практических задач. В области фундаментальных наук стало осуществимым исследование таких сложных проблем, как взаимодействие клеток в тканях, клеточная дифференцировка, морфогенез, реализация тотипотентности растительных клеток, механизмы появления раковых клеток и др. При решении практических задач основное внимание уделяется вопросам селекции, получения значительных количеств биологически ценных метаболитов растительного происхождения, в частности более дешевых лекарств, а также выращивания оздоровленных безвирусных растений, клонального размножения и др.

### 7.1. КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ

Бурное развитие клеточной инженерии растений приходится на 50-е годы XX в., хотя первые попытки выращивания изолированных кусочков ткани были сделаны гораздо раньше. В конце XIX — начале XX в. немецкие ученые Х. Фехтинг (1892), С. Рехингер (1893), Дж. Хаберландт (1902) сделали первую неудачную попытку стимуляции роста растительных тканей и органов, помещенных на фильтровальную бумагу, пропитанную сахарозой. Несмотря на отсутствие положительного результата, их работы представляют большой интерес. В них были высказаны идеи, которые намного опередили развитие науки того времени и которые нашли свое подтверждение несколько десятилетий спустя. Так, Фехтинг предположил, что полярность присуща не только организму или органу растения, но и самой клетке. Рехингер определил минимальный размер сегмента, образующего каллус. Согласно его исследованиям, в кусочках ткани тоньше 1,5 — 2,0 мм клетки не делились.



Хаберландт впервые четко сформулировал идеи о возможности культивирования *in vitro* изолированных клеток растений и о типотентности клеток, т.е. способности любой соматической клетки полностью реализовывать свой потенциал развития. Иначе говоря, о способности каждой растительной клетки давать начало целому организму.

Первые успехи были получены в 1922 г. американским ученым В. Роббинсом и немецким ученым В. Котте. Независимо друг от друга они показали возможность выращивания меристем кончиков корней томатов и кукурузы на синтетической питательной среде. Считается, что их работы легли в основу метода культуры изолированных корней растения.

Настоящее развитие метода культуры тканей и клеток высших растений началось в 1932 г. с работ французского ученого Р. Готре и американского исследователя Ф. Уайта. Они показали, что при периодической пересадке на свежую питательную среду кончики корней могут расти неограниченно долго. Кроме того, ими были разработаны методы культивирования новых объектов: тканей древесных растений камбияльного происхождения, каллусных тканей запасающей паренхимы (Р. Готре), а также тканей растительных опухолей (Ф. Уайт). С этого момента начинаются массовые исследования по разработке новых питательных сред, включающих даже такие неконтролируемые компоненты, как березовый сок или эндосперм кокоса, и по введению в культуру новых объектов. К 1959 г. насчитывалось уже 142 вида высших растений, выращиваемых в стерильной культуре.

В 1955 г. после открытия Ф. Скугом и С. Миллером нового класса фитогормонов — цитокининов — оказалось, что при совместном их действии с другим классом фитогормонов — ауксинами — появилась возможность инициировать деление дифференцированных клеток, поддерживать рост каллусной ткани, индуцировать морфогенез в контролируемых условиях.

В 1959 г. был предложен метод выращивания больших масс клеточных суспензий. Важным событием стала разработка Е. Коккингем (Ноттингемский университет, Великобритания) в 1960 г. метода получения изолированных протопластов. Это послужило толчком к получению соматических гибридов, введению в протопласты вирусных РНК, клеточных органелл, клеток прокариот. В это же время Дж. Морелом и Р. Г. Бутенко был предложен метод клонального микроразмножения, который сразу же нашел широкое практическое применение. Весьма важным достижением в развитии технологий культивирования изолированных тканей и клеток стало культивирование одиночной клетки с помощью ткани-«няньки». Этот метод был разработан в России в 1969 г. в Институте физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН под ру-

ководством Р. Г. Бутенко. В последние десятилетия продолжается быстрый прогресс технологий клеточной инженерии, позволяющих значительно облегчить селекционную работу. Большие успехи достигнуты в развитии методов получения трансгенных растений, технологий использования изолированных тканей и клеток травянистых растений, начато культивирование тканей древесных растений.

### **7.1.2. МЕТОДЫ И УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ ТКАНЕЙ И КЛЕТОК РАСТЕНИЙ**

Выращивание изолированных клеток и тканей на искусственных питательных средах в стерильных условиях (*in vitro*) получило название метода культуры изолированных тканей.

В связи с тем что в жизни человека наибольшее значение имеют семенные растения, методы и условия для их культивирования разработаны лучше, чем для голосеменных растений или водорослей, выращивание которых в стерильных условиях вызывает определенные затруднения. Однако независимо от принадлежности растений к той или иной таксономической группе существуют общие требования к выращиванию объектов в культуре *in vitro*.

**Асептика.** Прежде всего культивирование фрагментов ткани или органа растения — эксплантов, а тем более отдельных клеток требует соблюдения полной асептики. Микроорганизмы, которые могут попасть в питательную среду, выделяют токсины, ингибирующие рост клеток и приводящие культуру к гибели. Поэтому при всех манипуляциях с клетками и тканями при культивировании *in vitro* соблюдают определенные правила асептики в ламинар-боксе или в асептических комнатах. В первом случае асептика достигается подачей профильтрованного стерильного воздуха, направленного из ламинкар-бокса наружу, на работающего. Асептические комнаты стерилизуют с помощью ультрафиолетовых ламп, а работают в таких помещениях в стерильной одежде. Рабочую поверхность столов в асептических комнатах и инструменты перед работой дополнительно стерилизуют спиртом.

Чистую посуду, предварительно завернутую в бумагу или в фольгу, инструменты, бумагу, вату стерилизуют сухим жаром в сушильном шкафу при температуре 160 °С в течение 1,5 — 2 ч. Питательные среды стерилизуют в автоклаве при температуре 120 °С и повышенном давлении в течение 15 — 20 мин. Если в состав питательных сред входят вещества, разрушающиеся при автоклавировании, их следует стерилизовать путем фильтрации через бактериальный фильтр. Затем стерильные профильтрованные компо-

**Стерилизация исходного растительного материала**  
(по Р. Г. Бутенко, 1999)

Объект	Время стерилизации, мин		
	диацид 0,1%-й	сулема 0,1%-я	перекись водорода, 10 — 12%-я
Семена сухие	15 — 20	10 — 15	12 — 15
Семена набухшие	6 — 10	6 — 8	6 — 8
Ткани стебля	20 — 40	20 — 25	—
Листья	1 — 3	0,5 — 3	3 — 5
Апексы	1 — 10	0,5 — 7	2 — 7

ненты добавляют в проавтоклавированную среду, охлажденную до температуры 40 °С.

Растительные ткани сами по себе могут служить серьезным источником заражения, так как на их поверхности всегда находится эпифитная микрофлора. Поэтому необходима поверхностная стерилизация, которую проводят следующим образом. Предварительно часть растения, из которой будет извлечен эксплант, промывают водой с мылом и споласкивают чистой водой. Затем растительный материал стерилизуют в растворах дезинфицирующих веществ. Некоторые из этих веществ, а также время стерилизации представлены в табл. 7.1.

После выдерживания эксплантов в дезинфицирующем растворе их несколько раз промывают в дистиллированной воде и скальпелем удаляют наружный слой клеток на срезах эксплантов, так как он может быть поврежден при стерилизации.

Микроорганизмы могут находиться и внутри растительной ткани. Наиболее часто внутреннее инфицирование встречается у тропических и субтропических растений. Поэтому кроме поверхностной стерилизации иногда приходится применять антибиотики, которые и убивают микробную флору внутри ткани. Следует заметить, что подобная обработка не всегда приводит к стерилизации внутренних тканей, так как трудно выбрать направленно действующий антибиотик.

**Питательные среды.** Изолированные клетки и ткани культивируют на многокомпонентных питательных средах. Они могут существенно различаться по своему составу, однако в состав всех сред обязательно входят необходимые растениям макро- и мик-

роэлементы, углеводы, витамины, фитогормоны и их синтетические аналоги. Углеводы (обычно это сахароза или глюкоза) входят в состав любой питательной смеси в концентрации 2 — 3 %. Они необходимы в качестве питательного компонента, так как большинство каллусных тканей лишено хлорофилла и не способно к автотрофному питанию. Поэтому их выращивают в условиях рассеянного освещения или в темноте. Исключение составляет каллусная ткань мандрагоры, амаранта и некоторых других растений.

Обязательными компонентами питательных сред должны быть ауксины, вызывающие дедифференцировку клеток экспланта, и цитокинины, индуцирующие клеточные деления. При изменении соотношения между этими фитогормонами или при добавлении других фитогормонов могут быть вызваны разные типы морфогенеза.

Высокое содержание нитратов, ионов аммония, калия, фосфата способствует быстрому росту клеток. Истощение среды значительно снижает рост и процессы вторичного метаболизма. Однако изначально низкое содержание фосфатов в питательной среде способно стимулировать синтез вторичных метаболитов. Установлено, что культивирование каллусов солодки голой на среде с половинной концентрацией азота и фосфора в темноте увеличивает содержание фенольных соединений в 1,6 раза по сравнению с каллусами, растущими на полной среде. В среду могут быть добавлены эндоспермы незрелых зародышей (кокосовый орех, конский каштан и др.), пасока некоторых деревьев, различные экстракты (солодовый, дрожжевой, томатный сок). Введение их в среду дает интересные результаты, но такие эксперименты трудно воспроизводимы, так как действующий компонент, как правило, точно неизвестен. Например, добавление в питательную среду отдельных фракций кокосового молока не давало никаких результатов, в то время как нефракционированный эндосперм вызывал деление клеток.

При приготовлении твердых питательных сред для поверхностного выращивания каллусных тканей используют очищенный агар-агар — полисахарид, получаемый из морских водорослей. В качестве примеров в табл. 7.2 приведены составы наиболее распространенных питательных сред.

Среда Мурасиге и Скуга — самая универсальная. Она пригодна для образования каллусов, поддержания неорганизованного каллусного роста, индукции морфогенеза у большинства двудольных растений. Так, изменение соотношения ауксина и кинетина приводит к образованию либо корней (преобладание ауксина), либо стеблевых культур (преобладание кинетина).

Среда Гамборга и Эвелега хорошо подходит для культивирования клеток и тканей бобовых растений и злаков, среда Уайта обес-

**Состав питательных сред, применяемых при культивировании  
клеток и тканей (по Р. Г. Бутенко, 1999)**

Компонент сред	Концентрация питательных сред, мг/л			
	Мурасиге и Скуга, 1962	Гамборга и Эвелега, 1968	Уайта, 1939	Нича и Нич, 1974— 1975
KNO <sub>3</sub>	1 900	3 000	81	950
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1 650	—	—	720
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	—	—	142	—
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	—	—	—	—
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	—	134	—	—
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370	500	74	185
CaCl <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	—	—	—	166
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	440	150	—	—
KCl	—	—	65	—
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	—	12	68
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	—	150	—	—
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	—	10	—	—
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	22,3	—	—	25
ZnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	8,6	—	—	—
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	—	2	—	10
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	6,2	3	—	10
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,025	0,075	—	0,025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	—	0,25
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,025	—	—	—
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27,8	—	—	27,8
Na EDTA · 2H <sub>2</sub> O	37,3	—	—	37,3
Секвестрен 330-Fe	—	28	—	—
Мезоинозит	100	—	—	200
Аскорбиновая кислота	—	—	—	3
Тиамин-HCl	0,5	—	—	3
Пиридоксин-HCl	0,5	—	—	1
Никотиновая кислота	0,5	—	—	—
Сахароза	30 000	20 000	2 000	60 000
Агар «Дифко», гель- рит, агароза	—	—	—	7000

печивает укоренение побегов и нормальный рост стебля после регенерации, а среда Нича и Нич пригодна для индукции андрогенеза в культуре пыльников.

**Физические факторы.** На рост и развитие растительных тканей *in vitro* большое влияние оказывают физические факторы — свет, температура, аэрация, влажность.

**Свет.** Большинство каллусных тканей могут расти в условиях слабого освещения или в темноте, так как они не способны фотосинтезировать. Вместе с тем свет может выступать как фактор, обеспечивающий морфогенез и активирующий процессы вторичного синтеза. В качестве источника света используют люминесцентные лампы. Для большинства травянистых растений optimum освещенности составляет примерно 1 000 люкс. Слишком низкая (300 люкс) или высокая (3 000 — 10 000 люкс) освещенность подавляет рост. Освещение может влиять на метаболизм каллусных клеток. Так, в культурах чайного растения под действием света увеличивался биосинтез полифенолов. Напротив, в культуре клеток *Scopolia parviflora* свет подавлял образование алкалоидов. Кроме интенсивности освещенности на культуру ткани и ее физиологические особенности влияет качество света. Так, более 20 флавонов и флавоноловых гликозидов образуется в культурах клеток петрушки после освещения ее непрерывным люминесцентным светом «холодный белый». Вместе с тем синтез флавоновых гликозидов активируется при последовательном облучении ультрафиолетовым светом, а затем светом, лежащим в области «красный — длинноволновый красный».

**Температура.** Для большинства каллусных культур оптимальна температура 26 °С. В то же время каллусы и культуры клеток диоскореи дельтовидной хорошо растут даже при температуре 32 °С. В отличие от роста культур клеток и тканей индукция их морфогенеза требует более низких температур (18 — 20 °С). Влияние температуры на метаболизм клеток *in vitro* изучено слабо. Есть данные, что в каллусных культурах максимальное образование алкалоидов наблюдалось при температуре 25 °С, а при повышении температуры резко снижалось. В суспензионных культурах клеток *Ipromoea* содержание жирных кислот значительно увеличивалось, если их выращивали при субоптимальных температурах роста (15 °С). Поэтому при выращивании культуры *in vitro* необходимо тщательно изучать влияние всех абиотических факторов, в том числе температурного, на рост и метаболизм клеток.

**Аэрация.** Для выращивания суспензионных культур большое значение имеет аэрация. Особенно важно снабжение воздухом культивируемых клеток в больших объемах ферментеров.

При сравнении разных типов ферментеров было показано, что синтез вторичных метаболитов в суспензионной культуре был

наибольшим при подаче воздуха снизу. При выращивании клеток в малых объемах (в колбах) нормальная аэрация достигается при постоянном перемешивании суспензии.

**Влажность.** Оптимальная влажность в помещении, где растут культуры, должна составлять 60 — 70%.

Таким образом, культивирование клеток и тканей зависит от многих факторов внешней среды, и действие их не всегда хорошо известно. Поэтому при введении в культуру нового вида растений необходимо прежде всего тщательно изучить влияние физических факторов на рост и физиологические характеристики этой культуры.

### **7.1.3. ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКА КАК ОСНОВА КАЛЛУСОГЕНЕЗА**

Культура изолированных клеток и тканей обычно представлена каллусными и гораздо реже опухолевыми тканями. Каллусная ткань образуется в результате повреждения на целых растениях, а также в стерильной культуре на эксплантах — фрагментах ткани или органа, используемых для получения первичного каллуса. Возникновение каллуса связано с неорганизованным делением (пролиферацией) дедифференцированных клеток. Дедифференцировка — основа создания культуры каллусных клеток. В процессе дифференцировки клетки теряют способность делиться. Дедифференцировка — это возвращение клеток в меристематическое состояние, при котором они сохраняют способность к делению. У интактных растений дедифференцировка и индукция каллусогенеза возникают вследствие образования раневых гормонов (травматиновая кислота) при механическом повреждении. Обязательное условие дедифференцировки тканей экспланта и превращения их в каллусные клетки, помимо повреждения, — присутствие ауксинов и цитокининов. Среди ауксинов чаще всего используют 2,4-D (2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту), ИУК (индолил-3-уксусную кислоту), НУК ( $\alpha$ -нафтилуксусную кислоту), причем наибольшую активность проявляет 2,4-D. Из цитокининов в искусственные питательные среды обычно вносят кинетин, 6-БАП (6-бензиламинопурин), зеатин. Наиболее активны 6-БАП и зеатин. Функции этих двух групп гормонов в каллусогенезе разные, но они тесно связаны между собой. Ауксины вызывают процессы дедифференцировки клеток, подготавливают ее к делению. Затем цитокинины инициируют деление клеток. Последние исследования свидетельствуют, что ауксины индуцируют синтез главной протеинкиназы клеточного деления  $P_{34}^{cdc2}$ , а цитокинины — циклинов. Таким образом, действие этих гормонов проявляется только при последовательном или

одновременном внесении их в среду. Кроме того, оно будет зависеть от физиологического состояния клеток экспланта, от их компетентности к действию тех или иных внешних факторов. Результаты исследований показали, что полисахариды и какие-то неизвестные индукторы тоже могут вызывать деление клеток, приводящее к образованию каллуса.

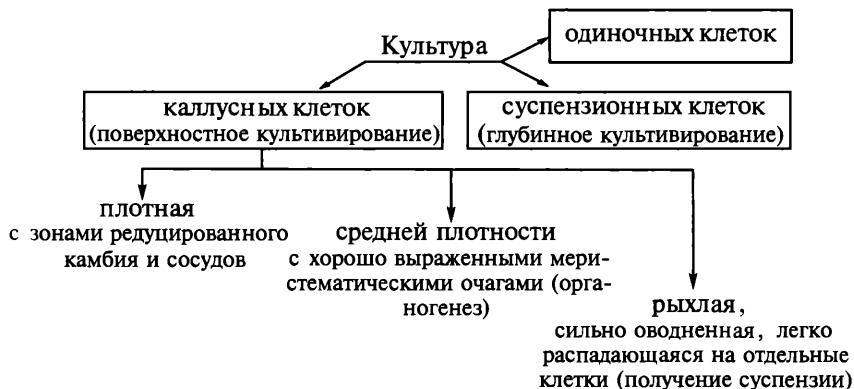
Во время процесса дедифференцировки, который у всех клеток сходен, клетки должны утратить характерные черты исходной ткани. В первую очередь они теряют запасные вещества — крахмал, белки, липиды. В них разрушаются специализированные клеточные органеллы, в частности хлоропласты, но возрастает число амилопластов. Кроме того, разрушается аппарат Гольджи, перестраиваются эндоплазматический ретикулум и элементы цитоскелета.

Через несколько часов после перенесения экспланта в условия *in vitro* начинается новый синтез белка. Он связан, вероятно, с механическим повреждением и действием гормонов, сохранившихся в экспланте с момента его изоляции из растения. Когда данные гормоны израсходуются, синтез белка прекращается. Если в это время клетки будут культивироваться на питательной среде, содержащей ауксины и цитокинины, то начнется каллусогенез, т. е. в результате дедифференцировки и деления клеток будет образовываться первичный каллус. Таким образом, специализированная клетка растительной ткани становится каллусной в результате дедифференцировки, т. е. восстановления у нее способности к делению.

#### **7.1.4. ТИПЫ КУЛЬТУР КЛЕТОК И ТКАНЕЙ**

В зависимости от способа, условий культивирования и происхождения можно выделить несколько типов культур клеток и тканей. Если культивирование происходит поверхностно на агаризованной питательной среде, то образуется культура каллусных клеток. Она не имеет четко выраженной структуры, но может различаться по плотности. Происхождение и условия выращивания определяют, будет ли каллусная культура рыхлой, средней плотности или плотной. Рыхлая культура каллусных клеток имеет сильно оводненные клетки, легко распадается на небольшие группы клеток и кластеры и поэтому может быть использована для получения суспензионной культуры. Культура каллусных клеток средней плотности характеризуется хорошо выраженными меристематическими очагами. В ней легко иницируются процессы органогенеза. Наконец, у плотных каллусных культур различают зоны редуцированного камбия и трахеидоподобных элементов:





Существует также суспензионная культура клеток, которую выращивают в жидкой питательной среде, так называемое глубинное культивирование. Клеточные суспензии образуются как из калусных клеток, так и непосредственно из экспланта. Для получения суспензионных культур предпочтительнее брать каллусы рыхлого типа. Если для этой цели необходимо использовать плотный каллус, то его можно разрыхлить, исключив из питательной среды соли  $\text{Ca}^{2+}$ . С этой же целью можно культивировать каллус на среде, содержащей ауксин 2,4-D или ферменты — пектиназу (0,2 мг/л) и целлюлазу (0,01 мг/л). Наилучший эффект достигается при добавлении ферментов. Суспензионные культуры клеток можно получить и непосредственно из экспланта по методу Ф. Стюарда. Для этого эксплант помещают в жидкую среду при постоянном автоматическом перемешивании. Дедифференцированные клетки отрываются от экспланта, образуя суспензию в питательной среде. Постоянное встряхивание — необходимое условие культивирования клеточных суспензий. Суспензионные клетки делятся в присутствии тех же двух групп гормонов (ауксинов и цитокининов), которые индуцируют деление клеток в калусных тканях. Следовательно, можно сказать, что суспензионные культуры представлены разными агрегатами калусных клеток.

Клеточные суспензии играют значительную роль в биотехнологии. Они могут быть использованы для получения изолированных протопластов, которые применяют для клеточной селекции, при введении чужеродных ДНК и других процессах. Клеточные суспензии культивируют в больших количествах для получения вторичных метаболитов, выявления новых веществ, для выращивания клеточной биомассы. Однако увеличение клеточной биомассы в результате деления клеток и синтез вторичных метаболитов разобщены во времени. Поэтому необходимо хорошо знать физиологию, свойства клеток в суспензионных культурах, чтобы получить

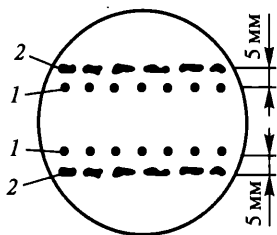


Рис. 7.1. Выращивание отдельных клеток с помощью метода «ткань-«нянька» (по Р. Г. Бутенко, 1999):

1 — одиночные клетки; 2 — каллусная культура-«нянька»

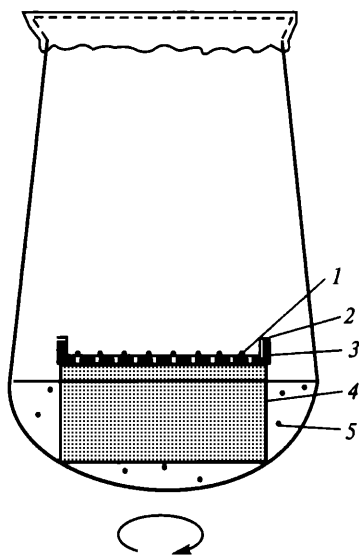


Рис. 7.2. Использование культуры суспензионных клеток в качестве «кормящего слоя» для выращивания изолированных протопластов и одиночных клеток кукурузы (Ву Дык Куанг, 3. Б. Шамина, 1985):

1 — колонии клеток; 2 — фильтровальная бумага; 3 — алюминиевая сетка; 4 — пенополиуретан; 5 — суспензия клеток

максимальный выход продукта. Состояние клеточных суспензий характеризуется плотностью клеточной популяции. За 14 — 16 дней (средняя длительность пассажа) плотность обычно повышается от  $5 \cdot 10^4$  до  $5 \cdot 10^6$  кл/мл. Качество суспензии определяется степенью агрегированности. Агрегаты должны содержать не более 10 — 12 клеток.

Большой интерес представляет культура одиночных клеток. Ее применяют в клеточной селекции для отбора гибридных клеток и их клонирования, а также для генетических и физиологических исследований. Например, вопрос о причинах генетической неоднородности легче решать, используя клон-потомство одной клетки, а не гетерогенную ткань исходного экспланта.

Однако культивирование одной или нескольких клеток связано с определенными трудностями, состоящими в том, что одиночная клетка живет, но не делится в тех условиях, которые разработаны для нормального роста и размножения клеток каллусной ткани. Поэтому при культивировании одиночных клеток потребовалась выработка специальных методов. Все они основаны на использовании так называемого «кондиционирующего фактора» — метаболитов, выделяемых в среду делящимися клетками. Когда на питательную среду высаживается одна клетка или небольшое их количество, они не делятся, так как выделяемого кондиционирующего фактора не хватает для индукции деления. Следовательно, необхо-

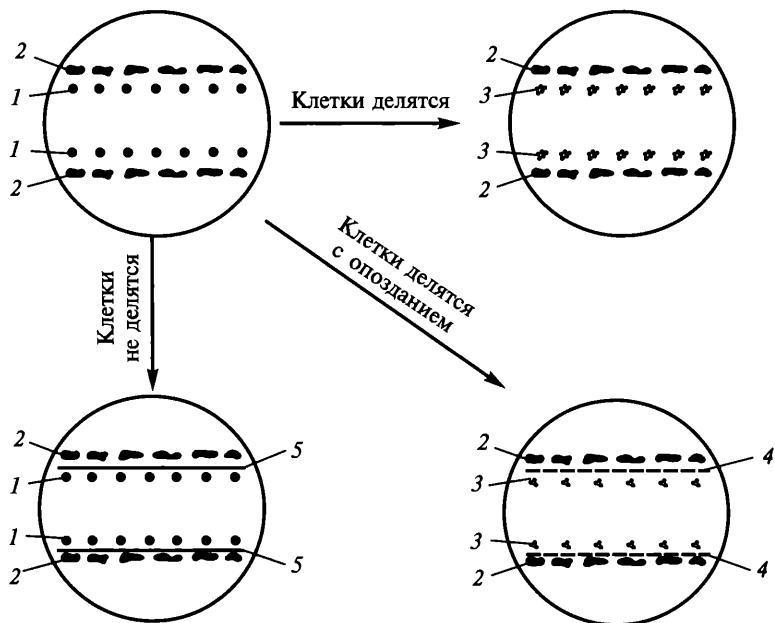


Рис. 7.3. Доказательство химической природы фактора кондиционирования:

1 — одиночные клетки; 2 — ткань-«нянька»; 3 — делящиеся клетки; 4 — целлофан; 5 — стеклянные пластинки

можно повысить концентрацию фактора в питательной среде. Этой цели служат следующие методы:

1. Метод «ткань-«нянька»». Кондиционирующий фактор выделяется находящимися рядом с одиночной клеткой кусочками ткани-«няньки» (рис. 7.1).

2. Метод «кормящий слой». Кондиционирующий фактор выделяют активно делящиеся клетки суспензионной культуры того же вида растений, что и одиночная клетка (рис. 7.2).

3. Кондиционирование среды. Метод осуществляется путем добавления в нее питательной среды, отфильтрованной от интенсивно делящихся клеток.

4. Культивирование одиночных клеток. Метод осуществляется в микрокапле, т. е. в очень малом объеме ( $\approx 20$  мкл) богатой питательной среды (Ю. Ю. Глеба).

Точно сказать, что представляет собой кондиционирующий фактор, пока невозможно. Согласно исследованиям А. И. Павловой и Р. Г. Бутенко (1969), этот фактор водорастворим, термостабилен, не заменяется фитогормонами, включает низкомолекуляр-

ные вещества. Химическая природа кондиционирующего фактора доказывается с помощью довольно простого эксперимента. Если разделить одиночные клетки и ткань-«няньку» стеклянной пластиной, то деления клеток не наступает. Если вместо пластин поместить целлофан, то хотя и с задержкой начинается деление одиночных клеток (рис. 7.3).

### **7.1.5. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КАЛЛУСНЫХ КЛЕТОК**

Каллусная клетка имеет свой цикл развития, аналогичный циклу всех других клеток: деление, растяжение, дифференцировка, старение и отмирание. Дифференцировку каллусных клеток принято называть вторичной. Однако ее не следует путать с вторичной дифференцировкой, на которой основан морфогенез. Рост каллусных тканей подчиняется общим закономерностям. Кривая роста каллусных тканей также имеет характер *S*-образной кривой (ростовая кривая Сакса) и включает пять фаз, длительность которых неодинакова у разных видов растений (рис. 7.4).

Первая фаза — латентная, или лаг-фаза, заключается в подготовке клеток к делениям.

Вторая — фаза экспоненциального роста (логарифмическая). В это время митотическая активность наибольшая, рост идет с ускорением, масса каллуса увеличивается.

Третья фаза — линейная, характеризуется постоянной скоростью роста каллусной массы.

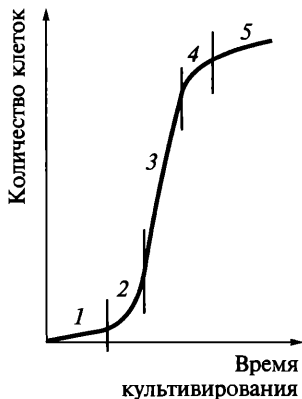
Четвертая — фаза замедленного роста, во время которой интенсивность деления клеток резко снижается. Во время пятой фазы — стационарной — масса каллуса не увеличивается, так как начавшееся отмирание клеток еще компенсируется за счет их деления. Далее следует отмирание каллуса.

Культивируемые каллусные клетки сохраняют многие физиологические особенности, свойственные клеткам растения, из которого они были получены. Сохраняются, например, такие свойства, как морозостойкость, устойчивость к абиотическим факторам (температура, засоление, фотопериодическая реакция), а главное, хотя и в разной степени, способность к синтезу вторичных метаболитов. Наряду с общими у каллусных клеток появляются свои, характерные только для них особенности.

Например, длительно культивируемые *in vitro* клетки высших растений, как каллусные, так и суспензионные, образуют специфическую популяцию, относящуюся к типу неполовых, — популяцию соматических клеток. Наиболее характерные свойства этой попу-

Рис. 7.4. Ростовая кривая при периодическом выращивании каллусных клеток.

Фазы роста: 1 — латентная; 2 — логарифмическая; 3 — линейная; 4 — замедленного роста; 5 — стационарного роста



ляции — физиологическая асинхронность и генетическая гетерогенность.

**Физиологическая асинхронность** — наиболее важное свойство неполовой популяции. Оно заключается в том, что в каждый данный момент времени клетки находятся в разных фазах роста: одни делятся, другие растут, а третьи уже стареют. Поэтому общее физиологическое состояние такой популяции принято оценивать по состоянию большинства клеток.

Причины возникающей асинхронности весьма разнообразны:

1. Особенности вида, сорта, генотипа индивидуального растения, а также особенности экспланта.
2. Стрессы культивирования, например неоптимальная для данного вида клеток среда.
3. Изменение баланса эндогенных гормонов и концентрации в среде экзогенных гормонов в течение выращивания.
4. Генетическая гетерогенность клеток и клонов.
5. Аномалия митотического цикла клеток *in vitro*.
6. Физические факторы (температура, свет, аэрация).

Асинхронность — устойчивое свойство популяции каллусных клеток. Если с помощью специфических воздействий синхронизировать пролиферацию клеток популяции, то уже через 3—4 деления она вновь становится асинхронной.

**Генетическая гетерогенность** — свойство клеток соматической популяции. Генетически стабильными считаются только клетки меристематических тканей. В клетках остальных тканей при культивировании могут возникать полиплоидия, анеуплоидия, хромосомные aberrации, генные мутации. Однако генетическую гетерогенность нельзя рассматривать как недостаток, поскольку она является необходимым условием существования популяции клеток и служит основой для их адаптации.

В качестве причин появления генетической гетерогенности можно назвать следующие:

1. Генетическая гетерогенность исходного материала. В растениях клетки характеризуются различной пloidностью, диплоидны только активно делящиеся меристематические клетки.

2. Нарушение коррелятивных связей при выделении первичного экспланта из растения.

3. Действие компонентов среды. Экзогенные гормоны и стимуляторы могут оказывать мутагенное действие. Ауксины, особенно 2,4-D, входящие в состав питательных сред, — мутагены; цитокинины способствуют полиплоидизации клеток.

4. Длительное субкультивирование, при котором накапливаются генетически измененные каллусные клетки.

После 5—6 пересадок новый кариотип клеточной популяции, как правило, стабилизируется, если условия культивирования остаются постоянными. В противном случае изменение физических или трофических факторов приведет к новым генетическим изменениям.

Генетическая нестабильность каллусных клеток имеет большое значение для селекционной работы, так как позволяет отбирать штаммы клеток с измененным генотипом. Эти клетки могут обладать уникальными свойствами: повышенной устойчивостью к неблагоприятным факторам, повышенной продуктивностью и т. д. Однако генетическая гетерогенность популяций каллусных клеток в культуре не влияет на сохранение в их геноме основных качеств вида и растения-донора.

**Гормоннезависимость.** Каллусные ткани от большинства растений *in vitro* образуются только в присутствии в питательной среде и ауксинов, и цитокининов. Исключение составляют, например, незрелые зародыши пшеницы и семядоли подсолнечника. Первые образуют каллусную ткань на питательной среде с 2,4-D, но без цитокининов. Вторые, напротив, — на среде, содержащей цитокинины, но без ауксинов. Вероятно, такая специфика связана с эндогенным содержанием фитогормонов и с компетентностью клеток. Однако при длительном культивировании практически у всех культур может возникать специфическое свойство гормоннезависимости, т. е. автономности по отношению к ауксинам и цитокининам. Эти культуры могут расти на среде без гормонов, что делает их похожими на опухолевые клетки и резко отличает от нормальных каллусных клеток. Внешне же такие гормоннезависимые клетки ничем не отличаются от каллусных.

Клетки, которые в процессе культивирования приобрели свойство автономности от присутствия в среде гормонов, называются «привыкшими». Ткани, образованные такими «привыкшими» клетками, называют «химическими опухолями» в отличие от растительных или генетических опухолей. Генетические опухоли возникают на межвидовых гибридах растений. Растительные опухоли имеют бактериальное или вирусное происхождение. Чаще всего растительные опухоли возникают при попадании в растения агробактерий. Так, *Agrobacterium tumefaciens* вызывает об-

разование корончатых галлов, *A. rhizodenes* — бородатого корня, *A. rubi* — стеблевого галла. Превращение растительных клеток в опухолевые связано с проникновением в них ДНК бактериальной клетки, так называемой Ti-плазмиды, которая значительно изменяет свойства клетки, в том числе экспрессирует гены, контролирующие синтез ауксинов и цитокининов. Гормоннезависимость «привыкших» клеток связана с изменением активности собственных генов, ответственных за синтез белков-ферментов, участвующих в синтезе гормонов. Таким образом, «привыкшим» тканям и растительным опухолям в равной степени свойственна гормоннезависимость, но у растительных опухолей она носит генетический характер. У «привыкших» клеток это свойство достигается главным образом за счет эпигеномных изменений. Существует еще одна особенность, позволяющая отличить «привыкшие» и опухолевые клетки от обычных каллусных. Обычно ни опухолевые, ни «привыкшие» ткани не способны к нормальной регенерации. Они могут образовывать уродливые органоподобные структуры, так называемые тератомы. В отдельных случаях у длительно культивируемых тканей удастся отодвинуть порог «привыкания» благодаря изменению состава питательных сред и добиться регенерации нормального растения.

### **7.1.6. МОРФОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ КАЛЛУСНЫХ КЛЕТОК КАК ПРОЯВЛЕНИЕ ТОТИПОТЕНТНОСТИ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ**

**Дифференцировка каллусных клеток.** Одна из наиболее интересных, но сложных проблем в биологии — развитие многоклеточных организмов. Изучение данного вопроса возможно несколькими путями. Так, большое распространение получило моделирование процессов онтогенеза на более простых системах. При этом используют изолированные ткани, клетки, протопласты, культивируемые в стерильных условиях. Преимущество этого процесса состоит в том, что нет необходимости постоянно учитывать результаты взаимодействия органов в целостной системе растительного организма. Кроме того, экспериментатор сам имеет возможность выбирать, изменять и повторять условия опыта в соответствии с поставленной задачей. После завершения дедифференцировки дальнейшее развитие каллусной клетки может идти в нескольких направлениях. Во-первых, это вторичная дифференцировка разной степени сложности. Во-вторых, в клетке может сформироваться состояние стойкой дедифференцировки («привыкание»), а следовательно, способность расти на безгормональ-

ной среде. В-третьих, каллусная клетка проходит свой цикл развития, завершающийся ее старением и отмиранием.

Наибольший интерес вызывает первый путь, фактически представляющий морфогенные процессы. В культуре каллусных тканей морфогенезом называют возникновение организованных структур из неорганизованной массы клеток.

Вторичная дифференцировка каллусной клетки может завершиться образованием в каллусной ткани отдельных дифференцированных клеток. Они имеют определенное строение и выполняют специфические функции. Примером служит образование эпибластов — клеток, в которых запасаются вторичные метаболиты. Это наиболее простой тип дифференцировки каллусной клетки. Более сложная гистологическая дифференцировка завершается образованием в каллусе различных тканей: млечников, волокон, трихом, элементов ксилемы (трахеи и трахеиды) и флоэмы (ситовидные трубки и клетки-спутницы). К самым сложным видам вторичной дифференцировки относятся органогенез — образование органов и соматический эмбриогенез — образование из соматических клеток эмбриоидов, биполярных зародышеподобных структур. Все эти типы дифференцировки возможны только благодаря тотипотентности: любая растительная клетка содержит полный набор генов, характерный для того организма, из которого она была выделена. Потенциальные возможности всех клеток этого растения одинаковы; каждая из них в определенных условиях может дать начало целому организму. Однако выяснено, что реально детерминируется только одна из 400—1 000 клеток, что, вероятно, связано с физиологическим состоянием клетки, с ее компетентностью. Так, у эксплантов стеблевого происхождения компетентны к действию экзогенных фитогормонов и, следовательно, способны к морфогенезу только клетки эпидермальных и субэпидермальных тканей (Тран Тан Ван, 1981). Однако компетентность клеток может приобретаться ими в процессе культивирования каллусной ткани, в условиях, индуцирующих морфогенез. Время, в течение которого в каллусных клетках возникает это свойство, изменяется в широких пределах. Кроме того, существенную роль в дифференциации играют генотип растения-донора, условия и физические факторы культивирования.

Все каллусные клетки, готовые к вторичной дифференцировке, т. е. детерминированные, характеризуются общими чертами. Эти клетки — «клетки-инициали» — образуют утолщенную клеточную стенку, обособляясь от остальных каллусных клеток. Для них характерно более крупное ядро, большее количество запасных веществ, меньшие размеры вакуолей. В «клетках-инициалих» начинается синтез определенных белков, интенсифицируется пентозофосфатный путь расщепления гексоз. Очень важно, что



между этими клетками, формирующими меристематические очаги, восстанавливаются плазмодесмы, которые практически отсутствуют в массе каллусных клеток.

Интересное предположение было высказано Л. Саксом и С. Тойвоненом (1963). Оно сводится к тому, что существует минимальная масса каллусных клеток, которая определяет способность уже детерминированных клеток к дальнейшему морфогенезу. Это подтвердилось в опытах с культурой семян ели: детерминация адвентивных побегов происходила в клеточных комплексах из 5—6 клеток (Б. С. Флинн и др., 1988). В исследованиях С. Номура и А. Комаине (1989) было показано, что развитие соматических зародышей детерминируется в 6—10-клеточном агрегате.

На регуляцию морфогенеза существенно влияет качество света. Показано (Л. Коппель, 1992), что морфогенный каллус образуется чаще на синем свете, чем на белом или красном. Изменения на уровне индивидуальных белков во время реализации морфогенетической программы в культуре тканей позволили говорить о существовании белков развития. Однако отсутствие специфических тестов на эти белки не позволяет их выявить. Вместе с тем при использовании гибридов, продуцирующих моноклональные антитела на мембранные белки соматических зародышей, удалось выявить полипептид с молекулярной массой 45 кДа, который встречается в ядре нескольких видов растений и возможно участвует в регуляции клеточного деления (Г. Смит и др., 1988). В настоящее время большое внимание уделяется генетическому аспекту морфогенеза, изучению соматического эмбриогенеза как генетически наследуемого признака. Роль основного двигателя процесса развития отводится дифференциальной активности генов. Предполагается, что гены, контролирующие соматический эмбриогенез, начинают экспрессироваться в критические периоды развития эмбрионидов (Н. А. Моисеева, 1991).

**Гистогенез.** Главную роль в преобразовании каллусных клеток в сосудистые элементы играют фитогормоны, в основном ауксины. Опыты по влиянию апикальной меристемы побега (место синтеза ауксинов) на гистогенез в каллусной ткани показали, что ниже места прививки апекса в каллусной ткани начинали образовываться сосудистые элементы. Тот же эффект наблюдался при нанесении на каллус ауксина с сахарозой. Интересно, что повышение концентрации сахарозы способствовало образованию элементов флоэмы, а понижение — образованию ксилемных элементов. Причем такое действие оказывала совместно с ауксином только сахароза, что позволяет говорить о ее регуляторной роли. Добавление к гормону других сахаров гистогенеза не вызывало. В некоторых случаях стимуляторами гистогенеза помимо ауксинов

могут быть и остальные фитогормоны. Так, было отмечено, что в каллусных тканях сои этот процесс начинается под действием гибберелловой кислоты и этилена.

**Органогенез.** Первые работы Ф. Скуга и С. Миллера по влиянию ауксинов и открытого ими кинетина на органогенез в каллусах растений показали прямую зависимость этого процесса от соотношения фитогормонов. Преобладание концентрации ауксина над цитокинином вызывает дифференцировку клеток, приводящую к образованию корневой системы. В этом случае регенерации целого растения не происходит. При увеличении концентрации цитокинина и уменьшении ауксина начинаются стеблевой органогенез и образование побега. Если его пересадить на свежую питательную среду с преобладанием ауксина, то наблюдается образование корней и регенерация целого растения. В настоящее время доказано, что для прохождения органогенеза очень большое значение имеют принадлежность растения-донора к классу двудольных или однодольных, его генотип, а также тип экспланта. Кроме того, морфогенез можно получить только при условии подбора оптимальной питательной среды, определенных физических факторов, балансе фитогормонов, присутствии сигнальных белков и белков-акцепторов в клетках.

Среди компонентов, входящих в состав питательных сред, важную роль играют ионы  $\text{NH}_4^+$  и  $\text{NO}_3^-$ . Присутствие аммонийного азота важно для начала морфогенеза, а добавление нитратного азота способствует росту и развитию образовавшихся структур. Фитогормоны, используемые для стимуляции органогенеза, не ограничиваются теперь только ауксинами и цитокининами. С этой целью в питательную среду вводят другие классы фитогормонов: абсцизины, гиббереллины, этилен.

Влияние типа экспланта на морфогенез было четко показано в работах Н. П. Аксеновой, Т. В. Бавриной, Т. Н. Константиновой. Они установили, что только экспланты, выделенные из верхних междоузлий, могут образовывать каллус, способный к флоральному морфогенезу. Каллусы, полученные на эксплантах из нижних междоузлий, давали начало только вегетативным органам.

Вопрос о механизме запуска вторичной дифференцировки у каллусных клеток остается открытым. В настоящее время самое раннее событие, связанное с морфогенезом, — это появление тканеспецифических белков. Установлено, что все морфогенетические изменения активируются и (или) контролируются специальными генами.

**Соматический эмбриогенез.** При соматическом эмбриогенезе клетка-инициаль дает начало зиготе. Регенерант, образующийся из соматического зародыша, полностью сформирован, что устраняет лишние затраты по укоренению полученных при органогенезе побегов. Кроме того, соматические эмбриониды точнее

воспроизводят генотип исходного растения по сравнению с растениями-регенерантами, полученными в результате органогенеза. Соматические зародыши представляют и чисто практический интерес, так как могут быть использованы для получения искусственных семян.

Соматический эмбриогенез очень важен для фундаментальных наук. Он позволяет изучать механизмы эмбриогенеза, так как почти все его фазы, за исключением первой, в растении и в культуре тканей совпадают. Наиболее ранняя из изученных фаз детерминации клетки по эмбриональному пути развития состоит в приобретении ею свойств полярности. Так, при определении плотности биоэлектрического потенциала для четырех морфогенных клеток оказалось, что максимальная плотность электрического тока была на полярных полюсах этой группы клеток. Переход клеток в следующую фазу эмбриогенеза сопровождался значительным повышением плотности тока. Предполагается, что морфогенные клетки могут поддерживать полярность за счет активного базипетального транспорта эндогенного ауксина, градиента биоэлектрических потенциалов, градиента ионов кальция.

В связи с этим особый интерес представляют работы Ю. Б. Долгих (1994), в которых было установлено, что слабый постоянный электрический ток (2 мкА) может быть индуктором эмбриогенеза. Соматический эмбриогенез фактически не зависит от экзогенных фитогормонов, только развитие сформировавшихся соматических зародышей начинается в отсутствие ауксинов в среде. Однако содержание эндогенных фитогормонов имеет решающее значение для индукции эмбриогенеза.

### **7.1.7. ИЗОЛИРОВАННЫЕ ПРОТОПЛАСТЫ, ИХ ПОЛУЧЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ**

Впервые термин «изолированные протопласты» был предложен Д. Ханстейном в 1880 г. Протопласт в целой клетке можно наблюдать во время плазмолиза. Изолированный протопласт — это содержимое растительной клетки, окруженное плазмалеммой. Целлюлозная стенка у данного образования отсутствует. Изолированные протопласты — одни из наиболее ценных объектов в биотехнологии. Они позволяют исследовать различные свойства мембран, а также транспорт веществ через плазмалемму. Главное их преимущество состоит в том, что в изолированные протопласты достаточно легко вводить генетическую информацию из органелл и клеток других растений, прокариотических организмов и из клеток животных. Е. Коккинг установил, что изолированный протопласт благо-

даря механизму пиноцитоза способен поглощать из окружающей среды не только низкомолекулярные вещества, но и крупные молекулы, частицы (вирусы) и даже изолированные органеллы.

Большое значение в создании новых форм растений для изучения взаимодействия ядерного генома и геномов органелл имеет способность изолированных протопластов сливаться, образуя гибридные клетки. Таким способом можно добиться получения гибридов от растений с разной степенью таксономической удаленности, но обладающих ценными хозяйственными качествами.

Впервые протопласты были выделены Дж. Клеркером в 1892 г. при изучении плазмолиза в клетках листа телореза (*Stratiotes aloides*) во время механического повреждения ткани. Поэтому этот метод назван механическим. Он позволяет выделить лишь небольшое количество протопластов (выделение возможно не из всех видов тканей); сам метод длительный и трудоемкий. Современный метод выделения протопластов заключается в удалении клеточной стенки с помощью поэтапного использования ферментов для ее разрушения: целлюлазы, гемицеллюлазы, пектиназы. Этот метод получил название ферментативного.

Первое успешное выделение протопластов из клеток высших растений данным методом сделано Е. Коккингем в 1960 г. По сравнению с механическим ферментативный метод имеет ряд преимуществ. Он позволяет сравнительно легко и быстро выделять большое количество протопластов, причем они не испытывают сильного осмотического шока. После действия ферментов смесь протопластов пропускают через фильтр и центрифугируют для удаления неразрушенных клеток и их осколков.

Выделить протопласты можно из клеток растительных тканей, культуры каллусов и суспензионной культуры. Оптимальные условия для изоляции протопластов для разных объектов индивидуальны, что требует кропотливой предварительной работы по подбору концентраций ферментов, их соотношения, времени обработки. Очень важным фактором, позволяющим выделять целые жизнеспособные протопласты, является подбор осмотического стабилизатора. В качестве стабилизаторов обычно используют различные сахара, иногда ионные осмотики (растворы солей  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KCl}$ ). Концентрация осмотиков должна быть немного гипертонична, чтобы протопласты находились в состоянии слабого плазмолиза. В этом случае тормозятся метаболизм и регенерация клеточной стенки.

Изолированные протопласты можно культивировать. Обычно для этого используют те же среды, на которых растут изолированные клетки и ткани. Сразу же после удаления ферментов у протопластов в культуре начинается образование клеточной стенки. Протопласт, регенерировавший стенку, ведет себя как изолиро-

ванная клетка, способен делиться и формировать клон клеток. Регенерация целых растений из изолированных протопластов сопряжена с рядом трудностей. Получить регенерацию через эмбриогенез удалось пока только у растений моркови. Стимуляцией последовательного образования корней и побегов (органогенез) добились регенерации растений табака, петунии и некоторых других растений. Следует отметить, что протопласты, изолированные из генетически стабильной клеточной культуры, чаще регенерируют растения и с большим успехом используются при исследованиях генетической модификации протопластов.

## **7.1.8. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КУЛЬТУР ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ**

### **7.1.8.1. Синтез вторичных метаболитов**

Помимо фундаментальных исследований метод культуры изолированных тканей широко используется в сельском хозяйстве и промышленном производстве (рис. 7.5). Примером может служить массовое клональное микроразмножение плодовоовощных и декоративных растений, а также их оздоровление от вирусных и других инфекций. С помощью культуры *in vitro* можно расширить возможности селекционной работы: получать клоны клеток, а затем и растения с запрограммированными свойствами. Благодаря способности клеток синтезировать в культуре вторичные метаболиты возникла отрасль промышленности, осуществляющая биологический синтез веществ, необходимых человеку.

В настоящее время известно примерно  $2 \cdot 10^4$  синтезируемых растениями веществ, которые используются человеком, и их количество постоянно увеличивается. Растения всегда служили источником пищи, эфирных масел, красителей и конечно же лекарственных соединений. Так, мак снотворный (*Papaver somniferum*) является источником болеутоляющего вещества — кодеина; из наперстянки (*Digitalis lanata*) получают дигоксин, тонизирующий сердечную деятельность; из хинного дерева (*Cinchona ledgeriana*) — антималярийное средство хинидин. Особое место занимают наркотики и стимулирующие вещества. В небольших, строго контролируемых количествах их используют в медицине. Однако при систематическом употреблении низких концентраций наркотиков возникают наркозависимость и стремление к увеличению употребляемой дозы. Применение высоких концентраций наркотика убивает человека. Наиболее известны опиум и героин из *Papaver somniferum*, кокаин из *Erythroxylon*, никотин из различ-

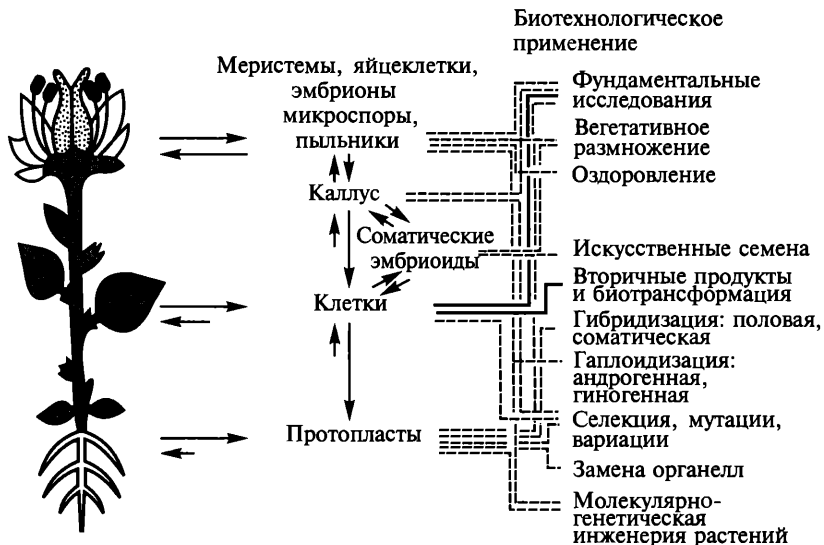


Рис. 7.5. Использование культуры клеток и тканей растений в биотехнологии (по Х. Борнман, 1991)

ных сортов табака. Наиболее известный стимулятор — кофеин, содержащийся в растениях чая и кофе. Стимуляторы не токсичны в концентрациях, рекомендуемых к применению. Однако высокие их концентрации негативно влияют на сердечно-сосудистую и нервную систему человека.

Большой интерес вызвало открытие пиретринов, выделенных из цветков *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Эти вещества — мощные инсектициды. Особая их ценность заключается в том, что пиретрины не вызывают привыкания у насекомых, а также не проявляют кумулятивного токсического эффекта.

Способность интактных растений синтезировать различные соединения привела к предположению, что тем же свойством будут обладать клетки и ткани этих растений, выращиваемые в стерильных условиях. Для некоторых культур это оказалось справедливым. Но в отдельных случаях клетки либо не проявляли способности к синтезу необходимых веществ, либо синтезировали их в минимальных количествах. Понадобились долгие эксперименты по подбору питательных сред, условий культивирования, исследованию новых штаммов, полученных благодаря генетической гетерогенности каллусных клеток или применению мутагенных факторов, чтобы добиться серьезных успехов в этой области.

В настоящее время промышленный синтез вторичных метаболитов — очень перспективное направление. Синтез вторичных

метаболитов происходит главным образом в суспензионной культуре клеток, в регулируемых условиях, поэтому он не зависит от климатических факторов, от повреждения насекомыми. Культуры выращивают на малых площадях в отличие от больших массивов плантаций с необходимыми растениями. Культуры клеток растений могут синтезировать практически все классы соединений вторичного обмена, причем довольно часто в количествах, в несколько раз превышающих их синтез в целых растениях. Например, выход аймалицина и серпентина в культуре клеток *Catharanthus roseus* составляет 1,3 % сухой массы, а в целом растении — 0,26 %. В культуре клеток *Dioscorea deltoidea* диосгенин синтезируется в количестве 26 мг на 1 г сухой массы, а в клубнях растений его содержание составляет 20 мг на 1 г сухой массы. Кроме того, в культурах клеток может начаться синтез веществ, не характерных для исходного растения, либо расширяется набор синтезируемых соединений. В ряде случаев в клеточной культуре образуются вещества, которые синтезировались интактным растением на ювенильной фазе развития, либо вещества, содержавшиеся в клетках филогенетически более ранних групп растений. Так, в культуре клеток *Papaver bracteatum* содержится сангвирин, характерный для ювенильных растений, и отсутствует тебаин, синтезируемый взрослыми растениями. А в культуре клеток живокости (*Delphinium*) синтезируются  $\Delta^7$ -стерины, присутствующие у архаичных групп растений.

Синтез вторичных соединений может коррелировать с процессом дифференцировки в культуре клеток. Например, в суспензионной культуре *Papaver somniferum* максимальный синтез алкалоидов начинается после того, как в ней дифференцируется достаточно большое количество специализированных клеток млечников, предназначенных для депонирования метаболитов. С другой стороны, культуры клеток табака и моркови синтезируют большое количество никотина и антоцианина соответственно, хотя их клетки слабо дифференцированы. Не существует также однозначного ответа на вопрос, как связан синтез вторичных метаболитов с ростовыми процессами. У большого числа культур вторичные метаболиты синтезируются и накапливаются в значительных количествах либо во время экспоненциальной фазы, когда ростовые процессы особенно активны, либо в период стационарной фазы роста культуры клеток, когда прирост клеточной массы прекращается. Однако есть культуры, например культура клеток *Catharanthus roseus*, у которых синтез вторичных метаболитов сопровождает весь период роста.

Важная особенность культивируемой популяции клеток — ее стабильность в отношении синтеза и накопления продуктов вторичного синтеза. Так, в отделе биологии клетки и биотехнологии

**Внутриклеточная локализация синтеза и накопления  
вторичных метаболитов (по Р. Г. Бутенко, 1999)**

Внутриклеточные метаболиты	Синтез	Накопление
Алкалоиды	Пластиды, цитоплазма	Вакуоль, хлоропласты, СП
<i>Терпеноиды</i> Монотерпены Тритерпены	Лейкопласты Хлоропласты, лейкопласты	СП Вакуоль, СП, цитоплазма
<i>Фенолы</i> Флавоноиды	Хлоропласты	Вакуоль, хлоропласты, СП
Танины Кумарины	Вакуоль, пластиды Вакуоль, хлоропласты, ЭПР	Вакуоль, СП, ЭПР Вакуоль
Оксикоричные кислоты	ЭПР, хлоропласты, митохондрии	Вакуоль, СП, хлоропласты
Цианогенные гликозиды	ЭПР	Вакуоль
Глюкозинолаты	ЭПР	Вакуоль
Бетаины	Предположительно цитоплазма	Вакуоль

ИФР РАН под руководством Р. Г. Бутенко были получены разные штаммы клеток *Dioscorea deltoidea*, в том числе штамм-сверхпродуцент ИФР ДМ-0,5. Все эти штаммы сохраняли стабильность в отношении синтеза фураностаноловых гликозидов около 26 лет. Интересная особенность большинства клеток в культуре состоит в том, что обычно эти клетки не транспортируют синтезируемые метаболиты в питательную среду или другие клетки, хотя некоторые культуры составляют исключение, в частности культура клеток мака, которые депонируют алкалоиды в млечники. Синтез вторичных метаболитов в культивируемых клетках связан с внутриклеточными органеллами, в основном с пластидами и эндоплазматическим ретикулулом. В клетках, не способных к транспорту метаболитов, продукты вторичного синтеза обычно накапливаются в вакуолях и свободном пространстве (СП) клеток (табл. 7.3).

На синтез вторичных метаболитов влияет целый ряд факторов. Прежде всего выход продукта зависит от генотипа растения-до-



нора. Показано, что культуры клеток, полученных от высокопродуктивных растений, продуцировали большее число метаболитов. Другой важный фактор — состав питательной среды и концентрация ее компонентов, которые должны, с одной стороны, обеспечивать увеличение количества клеток-продуцентов, с другой — усиливать сам процесс синтеза. На рост, т.е. на увеличение биомассы, существенно влияет природа и количество углеводов, соединений азота и фосфора, на синтез метаболитов — природа и концентрация фитогормонов. Так, при замене одного ауксина на другой, например нафтилуксусной кислоты на 2,4-D, трехкратно увеличился синтез антрахинона суспензионной культурой *Morinda citrifolia*.

Очень большое влияние на рост суспензионной среды оказывает ее непрерывное перемешивание, которое обеспечивает хорошую аэрацию и предотвращает осаждение клеток. В лабораторных условиях перемешивание достигается благодаря использованию качалок или роллерных установок. При промышленном выращивании суспензионных культур применяют специальные системы, в которых идут увеличение биомассы и синтез вторичных соединений, — биореакторы. Эти системы обладают важными преимуществами: возможностью управлять процессом культивирования на основе показаний датчиков; кроме того, большой объем культивируемого материала позволяет забирать значительные пробы, при этом стрессовые реакции у культуры клеток не возникают. В зависимости от способа перемешивания культуральной жидкости биореакторы делят на две группы.

Первая группа включает биореакторы, в которых суспензионная культура перемешивается только за счет подачи воздуха; во второй группе биореакторов культура перемешивается механическим способом (рис. 7.6).

Выращивание культур растительных клеток в биореакторах проводят в двух режимах. Первый режим — периодическое культивирование — заключается в том, что по окончании процесса откачивают и используют всю суспензию клеток. При втором режиме — проточном культивировании — в биореактор постоянно добавляют свежую питательную среду и одновременно отбирают тот же объем либо суспензии (открытое проточное культивирование), либо одной отработанной питательной среды, оставляя клетки в реакторе (закрытое проточное культивирование).

Существуют две разновидности открытого культивирования. Первая — турбидостат — подразумевает измерение и автоматическое поддержание концентрации клеточной биомассы в реакторе на одном уровне путем изменения скорости потока. Вторая разновидность — хемостат — заключается в подаче в биореактор

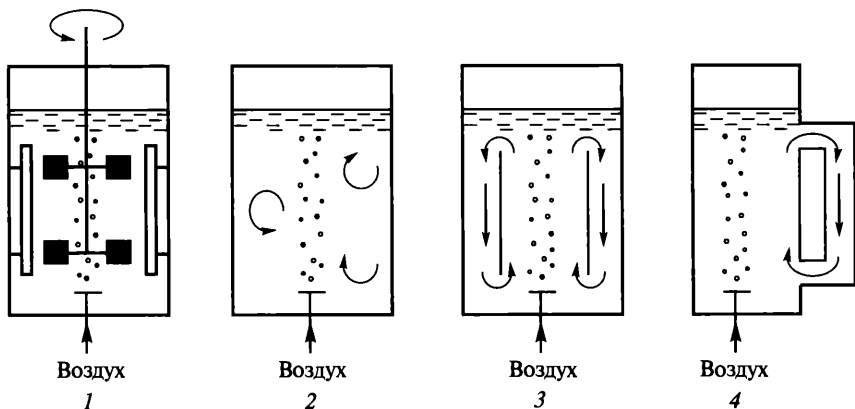


Рис. 7.6. Схема работы основных типов биореакторов:

1 — биореактор с механическим перемешивающим устройством; 2 — барботажный биореактор; 3 — аэролитный биореактор; 4 — биореактор с вынесенной циркуляционной петлей

с постоянной скоростью питательного раствора при одновременном откачивании с той же скоростью клеточной суспензии.

Существует еще одна современная технология получения вторичных метаболитов с помощью иммобилизованных клеток культуры, т. е. помещение их в определенный носитель или адсорбция в нем. Носитель с клетками помещают в питательную среду. Клетки остаются живыми. Они прекращают рост, но продолжают синтез метаболитов, выделяя их в среду.

Довольно часто синтез вторичных метаболитов в суспензионной культуре останавливается на промежуточных этапах, не доходя до необходимого продукта. Получение продукта возможно благодаря процессу биотрансформации. Сущность его состоит в изменении промежуточных метаболитов с помощью культур других растений или клеток бактерий. Биотрансформация очень эффективна в бактериальных клетках, поэтому растительные клетки используют, когда процесс не осуществляется в клетках микроорганизмов. Вводимые в эти культуры вещества могут подвергаться гидроксилированию, эпексидированию, глюкозилированию, этерификации, а также присоединяться к аминокислотам. Например, культура клеток женьшеня корневого происхождения способна трансформировать (гликозилировать) фенольные соединения — продукты деятельности суспензионной культуры клеток корня *Panax ginseng*. Культуры клеток лебеды и картофеля могут биотрансформировать индолил-3-уксусную кислоту в индолил-3-ацетил-L-аспарагиновую кислоту (Н. И. Рекославская и др., 1991).

Еще один пример — биотрансформация карденолидов, гликозиды которых используют в медицине для лечения болезней сердца. Растения наперстянки (*Digitalis lanata*) в большом количестве синтезируют дигитоксин вместо необходимого дигоксина. Для соответствующей биотрансформации с успехом используют недифференцированную суспензионную культуру наперстянки. Имобилизованные клетки этой культуры способны долгое время с постоянной скоростью трансформировать  $\beta$ -метилдигитоксин в  $\beta$ -метилдигоксин (А. В. Альферманн и др., 1987).

Таким образом, использование суспензионных культур для синтеза вторичных метаболитов в промышленных масштабах имеет большие перспективы, и не только с точки зрения экономической выгоды получения более дешевой продукции в запланированных количествах. Важно, что использование культуры клеток спасет от уничтожения тысячи дикорастущих растений, ставших уже редкими, которые синтезируют необходимые человеку вещества. Увеличение выхода продукта может быть достигнуто благодаря дальнейшей исследовательской работе по селекции специализированных популяций клеток и оптимизации условий культивирования. Большой интерес представляет также дальнейшее развитие методов биотрансформации метаболитов и иммобилизации культивируемых клеток.

### 7.1.8.2. Биотехнологии в сельском хозяйстве

Ускорение и облегчение селекционного процесса, а также создание растений с новыми качествами — это направления, которые достаточно успешно развиваются с помощью технологий клеточной инженерии, культуры клеток и тканей.

Две группы методов, благодаря которым развиваются данные направления, представлены в табл. 7.4.

Некоторые из указанных технологий стали традиционными, другие находятся на начальных этапах разработки. Наконец, есть такие методы, которые явно вышли из ранга вспомогательных, ускоряющих селекцию технологий. К ним можно отнести криосохранение генофонда — технологию, в настоящий момент приобретающую экологическую направленность; или клональное микроразмножение растений, тесно связанное с проблемой их оздоровления от вирусных и других инфекций. Поэтому обзор этих технологий вынесен за рамки данного раздела.

**Технологии, облегчающие селекционный процесс.** Одна из наиболее важных технологий этой группы — *оплодотворение in vitro*, помогающее предотвратить прогамную несовместимость, которая может быть вызвана следующими причинами:

**Клеточные технологии в селекции растений (по Р. Г. Бутенко, 1999)**

Облегчение и ускорение селекционного процесса	Создание генетического разнообразия и скрининга генотипов с важными признаками
Оплодотворение <i>in vitro</i>	Использование соматоклональных вариаций и получение индуцированных мутантов на клеточном уровне
Культура незрелых гибридных семян и зародышей (эмбрио-культура)	Клеточная селекция
Регенерация растений из тканей летальных гибридов	Гибридизация соматических клеток
Экспериментальная гаплоидия	Перенос чужеродных цитоплазматических генов
Клональное микроразмножение новых сортов, гибридов, линий (включая создание искусственных семян)	Перенос чужеродной генетической информации различного происхождения
Криосохранение генофонда	Адресный перенос ядерных генов

1) генетически детерминированное (определенное) несоответствие секрета рыльца материнского растения и пыльцы отцовского, которое тормозит рост пыльцевых трубок на рыльце пестика;

2) несоответствие длины столбика пестика и пыльцевой трубки, в результате чего пыльцевая трубка не достигает семяпочки (гетеростилия);

3) тканевая несовместимость партнеров, приводящая к остановке роста пыльцевой трубки в любой момент ее прорастания от рыльца пестика до микропиле семяпочки (гаметофитный тип несовместимости).

Преодоление прогамной несовместимости возможно благодаря выращиванию в стерильных условиях изолированной завязи с нанесенной на нее пылью или изолированных кусочков плаценты с семяпочками, рядом с которыми или непосредственно на ткани которых культивируется пыльца.

Значительным препятствием для селекции служит также постгамная несовместимость, вызванная разновременным развитием

зародыша и эндосперма при отдаленной гибридизации. В результате образуются несовместимые шуплые семена. Получить растение из таких семян можно только при использовании *метода эмбриокультуры*, т. е. выращивания изолированного зародыша на искусственной питательной среде *in vitro*. Метод эмбриокультуры широко применяют при межвидовой гибридизации овощных растений, для микроразмножения ценных гибридов, для клеточной селекции.

Большое значение имеет *создание гаплоидов*, позволяющее ускорить процесс селекции в 2—3 раза. Использование гаплоидных клеток и гаплоидных растений способствует обнаружению экспрессии введенного в клетку генома, редких рекомбинаций, рецессивных мутаций, которые в диплоидных растениях, как правило, маскируются доминантными генами. Из гаплоидных клеток можно выделить протопласты; сливаясь, они образуют гибридные клетки и растения с диплоидным числом хромосом. Обработывая гаплоидные клетки колхицином, можно добиться удвоения числа хромосом и получить диплоидные гомозиготные растения. Все это значительно облегчает выявление и стабилизацию необходимых признаков. Кроме селекции гаплоиды применяются также в генно-инженерных исследованиях. Впервые возможность получения спонтанных гаплоидов при аномальном развитии пыльников, пыльцы и других объектов была показана в 1964 г. С. Гуха и С. Магешвари. В настоящее время в культуре гаплоидные растения получают из изолированных пыльников (андрогенез), изолированных семяпочек (гиногенез), из гибридного зародыша, у которого в результате несовместимости потеряны отцовские хромосомы (партеногенез). Новые сорта ячменя — Исток и Одесский-15 — были выведены благодаря комбинации партеногенетического метода с культурой изолированных зародышей за 4 года вместо 10—12 лет, необходимых для обычной селекции.

**Создание генетического разнообразия исходных форм растений и скрининга генотипов.** Соматоклональная изменчивость — прекрасный источник генетического разнообразия (соматоклональных вариаций), которое может быть реализовано в создании генетически измененных растений-регенерантов с новыми свойствами (*соматоклональные варианты*, или *соматоклоны*). Помимо повышения генетического разнообразия использование соматоклональных вариантов в два раза может ускорить процесс выведения нового сорта даже для размножаемых семенами растений. Первые соматоклональные варианты табака были получены в Институте физиологии растений им. К. А. Тимирязева (Н. А. Загорина, З. П. Шамина, 1970).

Соматоклональные вариации нельзя рассматривать как случайные спонтанно возникающие мутации. Генетические изменения, характерные для соматоклональных вариаций, сложны и носят комплекс-

ный характер. Частота таких генетических изменений на три порядка превышает частоту спонтанных мутаций. Кроме того, соматоклональные варианты отличаются от исходного растения не только качественными моногенными признаками, но и количественными — полигенными (интенсивность роста, продуктивность, устойчивость к неблагоприятным факторам внешней среды).

Отмечены случаи появления соматоклональных вариантов, сочетающих признаки, которые невозможно или трудно соединить в одном генотипе традиционным селекционным путем. Так, Л. А. Кучеренко (1986) выделила из соматоклональных вариантов, возникших в каллусной культуре риса, растения, сочетавшие скороспелость и длиннозерность. На их основе за короткий срок был создан новый сорт риса.

По-разному сказываются на генетических изменениях и, следовательно, на появлении соматоклональных вариаций различные типы морфогенеза. Экспериментально установлено, что при соматическом эмбриогенезе цикл «клетка — растение» совершается значительно быстрее, чем при органогенезе. Поэтому степень различия между полученным и исходным родительским генотипом в случае органогенеза может быть значительно выше, чем при эмбриогенезе.

Источником генетического разнообразия растительного материала могут быть не только соматоклональные вариации, но и мутагенез, в несколько раз повышающий образование стабильно устойчивых по искомым признакам клонов клеток.

После получения различных соматоклональных вариаций от исходного растения наступает следующий этап — отбор необходимых сочетаний признаков. Данный вопрос решается с помощью *клеточной селекции*, которую проводят практически на любом объекте, введенном в культуру *in vitro*. Однако удобнее использовать суспензионную культуру или изолированные протопласты. Преимущество этих объектов состоит в быстром росте культуры и равномерном действии селективного фактора на все клетки. Для отбора соматоклональных вариаций соответствующие селективные факторы (соли в высоких концентрациях, гербициды и др.) добавляют в питательную среду для выращивания культуры клеток либо растущие культуры помещают в селективные условия (низкая или высокая температура, освещенность и т. д.). Существует несколько методов клеточной селекции:

1. Прямая (позитивная) селекция, при которой выживает только заданный тип мутантных клеток.

2. Непрямая (негативная) селекция, которая ведет к гибели делящихся клеток дикого типа и выживанию метаболически неактивных клеток. Этот прием требует дополнительной идентификации мутационных изменений у выживших клеток.

3. Тотальная селекция, при которой индивидуально тестируются все клеточные клоны.

4. Визуальная селекция и неселективный отбор, когда необходимая вариантная линия выбирается среди прочих визуально или с помощью биохимических методов.

Для отбора клеток, устойчивых к неблагоприятным или стрессовым факторам, наиболее часто применяют прямую селекцию. После выбора нужной популяции необходимо проверить стабильность устойчивости к неблагоприятному фактору. Это длительный процесс, включающий многочисленные циклы выращивания и пересадки клеток на среды, содержащие селективный фактор или без него. Из стабильных клонов необходимо попытаться регенерировать растения. Получение растений-регенерантов, а также гибридологический анализ подтверждают генетическую природу признака, а не адаптационный его характер. Следует, однако, отметить, что кропотливая работа по клеточной селекции не всегда приводит к нужному результату. Это связано с различием механизмов клеточной устойчивости и устойчивости растений. Либо клеточная устойчивость может быть только частью общего механизма, работающего в целом растении, как это наблюдается при создании устойчивости к засолению. Вместе с тем механизмы устойчивости к низким температурам, гербицидам, высоким концентрациям алюминия имеют, по-видимому, сходный характер у клеток и у целых растений. В последнем случае есть возможность получить из устойчивых клеточных популяций растение-регенерант, устойчивое к тому же фактору. Затем из большого числа соматклонов отбирают и проверяют в полевых условиях на стабильность те, которые имеют хозяйственно важные признаки, восполняющие отдельные недостатки исходного сорта. Так, после трехлетних полевых испытаний соматклонов сорта Любимец удалось выделить линии, превосходящие сорт по урожайности, устойчивости к фитофторе и степени зараженности вирусами.

Метод негативной селекции используется главным образом для выявления мутантов, ауксотрофных в отношении аминокислот, пуриновых и пиримидиновых оснований, витаминов и других важных метаболитов (Ю. Б. Долгих, З. П. Шамина, 1982). Ауксотрофные мутанты очень ценны для фундаментальных исследований механизмов генной регуляции синтеза этих веществ в клетке и в растении.

**Гибридизация соматических клеток.** Данный процесс осуществляется благодаря слиянию протопластов, изолированных из соматических клеток растений, и служит для создания новых генотипов, новых форм растений. Использование изолированных протопластов позволяет решать множество теоретических и практических задач. С их помощью можно вести селекцию на клеточ-

ном уровне, работать в малом объеме с большим числом индивидуальных клеток, осуществлять прямой перенос генов, изучать мембраны, выделять пластыды. Протопласты непременно участвуют в соматической гибридизации. Термин «соматическая гибридизация», означающий процесс слияния протопластов соматических клеток, был введен Дж. Мельхерсом в 1974 г.

Соматическая гибридизация имеет важные особенности. Во-первых, этому процессу доступны практически любые скрещивания, перенос генов на далекие таксономические расстояния. Во-вторых, слияние протопластов способствует объединению цитоплазматических генов родительских клеток, чего не бывает при скрещивании половых клеток.

Самопроизвольное слияние протопластов происходит достаточно редко. Механизм этого процесса до конца не выяснен. Однако известно, что протопласты имеют отрицательный поверхностный заряд, который вызывает их взаимное отталкивание. Для слияния это отталкивание необходимо преодолеть специальными приемами, способствующими снятию или перераспределению поверхностного заряда мембран. Впервые искусственное слияние протопластов с помощью индуктора слияния (фьюзогена) было осуществлено в 1970 г. Э. Коккингем и его сотрудниками. В настоящее время в качестве эффективных фьюзогенов используют полиэтиленгликоль (ПЭГ) и растворы с рН 9—11 и высокой концентрацией ионов кальция. Согласно одной из гипотез, объясняющих слияние протопластов при использовании ПЭГ, высокая концентрация этого вещества (20—30 %) способствует поглощению всей свободной воды между протопластами, вызывая их слипание в результате дегидратации. Кроме того, поглощение свободной воды индуцирует образование пор в мембране, через которые перетекает внутриклеточное содержимое. Если повреждения мембран обратимы, слипшиеся протопласты регенерируют клеточную стенку (рис. 7.7).

Кроме того, существует физический фактор — импульсы электрического тока, который также заставляет протопласты сливаться. Обработка электрическими импульсами, как и обработка ПЭГ, приводит к обратимому повреждению мембран. Применение переменного тока вызывает диэлектрофорез, и протопласты, находящиеся между электродами, выстраиваются в ряд, примыкая друг к другу своими полярными поверхностями. Импульс постоянного тока приводит к образованию пор, через которые происходит слияние (рис. 7.8).

При соматической гибридизации развиваются клетки двух типов: гибриды и цибриды. При образовании гибридов объединяется ядерный геном обеих клеток. Цибридная клетка содержит цитоплазму обоих партнеров, а ядро — одного. Такой результат до-



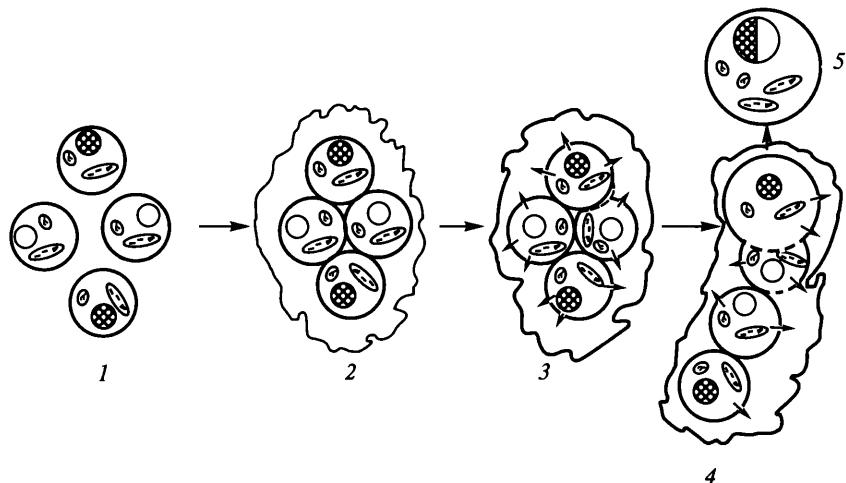


Рис. 7.7. Схема слияния протопластов под действием полиэтиленгликоля (по Х. Борнман, 1991):

1 — изолированные протопласты; 2 — слипание протопластов в результате дегидратации; 3 — образование пор в мембране протопласта; 4 — перетекание через поры внутриклеточного материала; 5 — гибридный протопласт

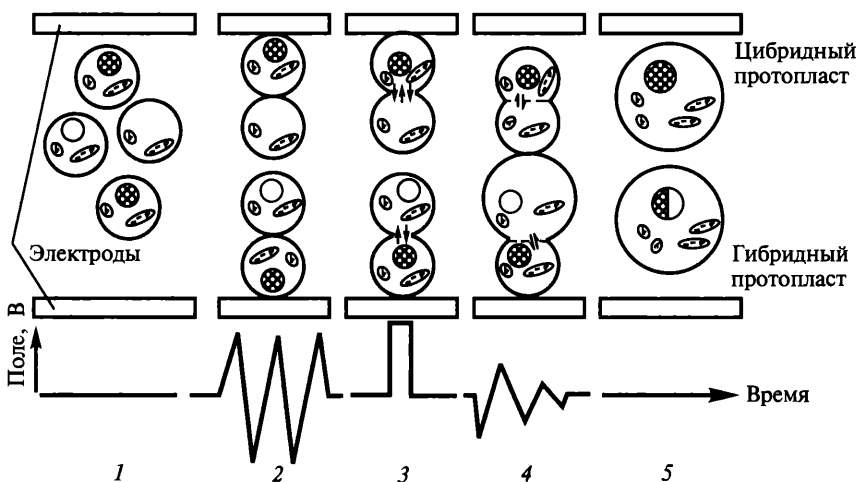


Рис. 7.8. Схема слияния протопластов под действием электрического поля (по Х. Борнман, 1991):

1 — изолированные протопласты; 2 — слипание протопластов полярными поверхностями; 3 — образование пор в мембранах под действием сильного импульса постоянного тока; 4 — смешивание цитоплазмы; 5 — образование гибридных (гибридных) протопластов

стигается при деградации одного из ядер после слияния или в том случае, если один из протопластов был лишен ядра.

Первый неполовой гибрид высших растений был получен в 1972 г. при слиянии изолированных протопластов двух видов табака: *Nicotiana glauca* и *Nicotiana langsdorfii*. В настоящее время получено много межвидовых, межсемейственных и межтрибных гибридов, значительную часть которых нельзя считать нормальными растениями, а некоторые гибриды (гибрид арабидопсиса и турнепса) представляют собой растения-монстры. Возникающие аномалии — результат хромосомной несбалансированности. Описаны случаи возникновения гибридов между протопластами эритроцитов крысы и дрожжевых клеток, моркови и человека и др. Любые исследования, любые манипуляции в области создания новых генотипов должны быть тщательно и всесторонне продуманы, а ученые должны помнить об ответственности и научной этике. Профессор Колумбийского университета Э. Чаргафф предупреждал о том, что «в тысяче опытов, вероятно, ничего не случится, но затем в одном каком-то случае произойдет нечто очень неприятное...». Он был «убежден, что именно попытка преобразовать или перехитрить природу почти привела к ее гибели...».

**Введение в протопласты макромолекул, клеточных органелл и бактериальных клеток.** Чужеродный генетический материал можно переносить в клетку не только при соматической гибридизации, но и при непосредственном введении ДНК или органелл, содержащих ДНК, в изолированные протопласты. Работы в этом направлении начаты не так давно, но уже получены интересные результаты. Так, поглощение экзогенных макромолекул ДНК показано у протопластов петунии, сои, моркови. Проведена трансплантация органелл (ядер, митохондрий, хлоропластов) в протопласты растений. Наибольшую важность представляют опыты по трансплантации хлоропластов одних растений в клетки других. П. Карлсон провел опыты по введению хлоропластов нормального зеленого растения *Nicotiana suaveolens* в протопласты пестролистного мутанта *N. tabacum*. В результате культивирования протопластов были получены зеленые каллусы, из которых регенерировали растение, оказавшееся пестролистным. Для того чтобы понять, содержит растение-регенерант элементы геномов двух видов табаков или только одного, проанализировали белковую фракцию I, в которую входит ключевой фермент цикла Кальвина — рибулозобисфосфаткарбоксилаза. Этот фермент состоит из двух больших субъединиц и двух малых. Большие субъединицы кодируются геномом хлоропластов, малые — ядерными генами. Анализ состава белковой фракции I растения-регенеранта показал присутствие полипептидов, характерных и для

пластид *N. tabacum*, и для пластид *N. suaveolens*. Перспективность работ по трансплантации хлоропластов заключается в том, что введение высокоэффективных хлоропластов может способствовать активации фотосинтеза и повышению продуктивности других растений.

Среди бактериальных клеток к созданию искусственных ассоциаций с растительными клетками наиболее способны цианобактерии. Это может быть связано с тем, что они часто вступают в симбиотические отношения с другими организмами; что древние цианобактерии, вероятно, участвовали в формировании растительных клеток в процессе эволюции; что цианобактерии способны выделять в среду разнообразные вещества: углеводы, аминокислоты, вещества гормональной природы и другие, которые могут быть использованы культивируемыми клетками растений. Растительные клетки способны потреблять кислород, образующийся в процессе фотосинтеза цианобактерий, а цианобактерии потребляют диоксид углерода, выделяемый растительными клетками при дыхании. Кроме того, азотфиксирующие цианобактерии могут накапливать азот в почве и обеспечивать до 15 % потребностей растений в нем. Например, симбиоз папоротника *Azolla* с *Anabaena azollae* применяют в сельском хозяйстве в качестве источника связанного азота на рисовых полях.

Большой интерес вызывает тот факт, что цианобактерии могут выступать в качестве фототрофного компонента ассоциаций с растительными клетками. Использование питательных сред, в которых не хватает источника углерода, показало, что прирост растительных клеток может быть обеспечен за счет усвоения ими продуктов фотосинтеза цианобактерий или их лизиса. Однако не все сочетания растений и цианобактерий оказывают взаимное благотворное влияние. Выявлена видовая специфичность взаимодействия партнеров. Так, клетки культуры мака и *Anabaena variabilis* взаимно подавляли рост друг друга. В то же время на рост культивируемых клеток табака, женьшеня, диоскореи цианобактерии оказывали стимулирующее влияние. В большинстве случаев существенное влияние одного партнера на ростовые процессы другого не выявлялось.

Совместное выращивание растительных клеток и цианобактерий имеет еще одну важную особенность. На дефицитной среде оно может приводить к увеличению синтеза вторичных метаболитов по сравнению с их накоплением в монокультуре на полной среде.

Введение азотфиксирующих цианобактерий в культуру растительных клеток могло бы наряду с применением методов генной инженерии решить проблему азотфиксации. Показано, что в смешанных культурах каллуса табака и цианобактерий на среде Мурасиге и Скуга формировались побеги регенерантов табака с уча-

стками сине-зеленого цвета, где локализовались цианобактерии. Вероятно, большие межклетники в каллусах табака способствуют проникновению цианобактерий сначала в межклетники каллусной ткани и в область меристемоидов, а затем — в формирующиеся побеги. Цианобактерии сохранялись на поверхности и в тканях стебля и листьев при многочисленных пересадках, образовании вторичных каллусов и последующей регенерации из них побегов, т. е. образовывалась устойчивая ассоциация растительной и бактериальной клетки. Азотфиксирующие цианобактерии обеспечивали рост растительных клеток в суспензионных и каллусных смешанных культурах на питательных средах, дефицитных по азоту, а в ассоциациях с растениями — и в песчаной культуре, не содержащей связанного азота. Это действие обеспечивается, по-видимому, за счет продуктов азотфиксации, выделяющихся в среду. В свою очередь, цианобактерии могут получать от растений углеводы. Причем цианобактерии, предварительно культивируемые с растительными клетками, получают от побегов в 2,5 раза больше меченых соединений углерода по сравнению с цианобактериями, взятыми из чистой культуры. В результате такого потребления растение-хозяин может значительно снизить интенсивность собственных ростовых процессов. Поэтому прежде чем приступить к практическому использованию искусственных ассоциаций, необходимо решить проблему обеспечения азотфиксирующего симбионта органическими веществами без нанесения существенного ущерба растению.

### **7.1.8.3. Клональное микроразмножение и оздоровление растений**

Клональным микроразмножением называют неполовое размножение растений с помощью метода культуры тканей, позволяющее получать растения идентичные исходному. В основе получения таких растений лежит способность соматических клеток растений полностью реализовывать свой потенциал развития, т. е. свойство тотипотентности. Метод клонального микроразмножения получает все более широкое распространение во всем мире. В большинстве стран эта технология приобрела коммерческий характер.

В России первые работы по клональному микроразмножению были проведены в 60-х годах XX в. в лаборатории Р. Г. Бутенко (Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева). В настоящее время созданы и развиваются лаборатории клонального микроразмножения, связанные с нуждами селекции, размножением декоративных, лекарственных и других растений. Кроме

того, технология используется для размножения лучших экземпляров взрослых лесных деревьев, особенно хвойных, для сохранения редких и исчезающих видов растений.

Свое название эта технология размножения получила от термина «клон» (от греч. *clon* — отпрыск), который предложил Веббер в 1903 г. Клональное микроразмножение имеет существенные преимущества перед традиционными способами размножения:

1. Высокий коэффициент размножения. Одно растение герберы за год при микроклональном размножении дает до 1 млн новых растений, тогда как при обычных способах размножения — только 50 — 100 растений. Большинство культивируемых в настоящее время сортов лилий размножается только вегетативно. Луковички возникают на материнских луковицах или на побеге в небольших количествах. Технология микроклонального размножения позволяет получить из одной чешуи луковицы за 6 месяцев  $10^5$  новых растений (сорт Red Carpet).

2. Получение генетически однородного посадочного материала.

3. Возможность оздоровления растений, освобождения их от вирусов благодаря клонированию меристематических тканей.

4. Возможность размножения растений, которые в естественных условиях репродуцируются с большим трудом.

5. Воспроизведение посадочного материала круглый год, что значительно экономит площади, занимаемые маточными и размножаемыми растениями.

6. Сокращение продолжительности селекционного периода, ускорение перехода растений от ювенильной фазы развития к репродуктивной.

**Технология микроклонального размножения.** Обязательное условие клонального микроразмножения — использование объектов, полностью сохраняющих генетическую стабильность на всех этапах процесса, от экспланта до растений в поле. Такому требованию удовлетворяют апексы и пазушные почки органов стеблевого происхождения, т. е. меристематические ткани. Их устойчивость к генетическим изменениям, вероятно, связана с высокой активностью систем репарации ДНК, а также с негативной селекцией измененных клеток.

Процесс клонального микроразмножения можно подразделить на три этапа:

1. Получение хорошо растущей стерильной культуры. На этом этапе необходимо правильно выбрать растение-донор, получить свободную от инфекции культуру, добиться ее выживания и быстрого роста на питательной среде.

2. Собственно размножение, осуществляемое несколькими способами:

активизация пазушных меристем;  
индукция образования адвентивных почек тканями листа, стебля, чешуйками и донцем луковиц, корневищем и зачатками соцветий без первоначального образования каллусной ткани;  
микрочеренкование побега, сохраняющего апикальное доминирование;  
стимуляция образования микроклубней и микролуковичек;  
индукция соматического эмбриогенеза.

3. Подготовка к высадке в поле или к реализации. Это очень важный этап, во время которого в теплице укорененные растения, полученные *in vitro*, адаптируют к новым условиям внешней среды: проводят закаливание растений, повышают их устойчивость к патогенным микроорганизмам и различным неблагоприятным факторам внешней среды. Существует много различных способов адаптирования растений к пересадке *in vivo*. Это подбор почвенного субстрата, создание определенной влажности, обработка химическими веществами (глицерин, парафин) для предотвращения обезвоживания листьев. Некоторые древесные растения лучше приживаются, если их заразить *in vitro* микоризообразующими грибами (Е. А. Калашникова, 1993). Упрощенный способ адаптации пробирочных растений винограда был разработан в Институте физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН. Адаптацию проводят прямо в пробирках, снимая с них пробки, когда растения винограда дорастают до верха пробирки. Через 1,5 — 2 недели, когда верхушки побега с двумя развитыми листьями появляются над пробиркой, растение готово к пересадке в почву. Для предотвращения механических повреждений корневой системы растение пересаживают в почву вместе с агаром, заглубляя его так, что над поверхностью почвы остаются только 2 развитых листа, которые выросли из пробирки и уже адаптировались к внешним условиям. Такая методика позволяет значительно упростить, ускорить и удешевить этап акклиматизации растений.

Клональное микроразмножение растений проводят разными способами. *Первый, основной, способ* — активизация пазушных меристем. Он состоит в снятии апикального доминирования и активизации развития меристем, существующих в растении. Этот способ основной и в обычном вегетативном размножении. И на интактном растении, и в случае клонирования снятие апикального доминирования достигается или удалением апикальной меристемы побега, или благодаря действию цитокинина. При клонировании цитокинины (6-бензиламинопурин, 6-фурфуриламинопурин, зеатин) добавляют в питательную среду, что приводит к развитию многочисленных пазушных побегов. Эти побеги отделяют от первичного экспланта и культивируют на свежей питательной среде. Активизацию пазушных меристем широко

используют в промышленном размножении овощных сельскохозяйственных культур (картофель, томаты, огурцы, сахарная свекла, топинамбур и др.), цветов (гвоздика, роза, гербера), плодовых и ягодных культур (яблоня, вишня, малина, крыжовник и др.), древесных растений (туя, можжевельник и др.). Однако бесконечно размножать таким способом растения нельзя, поскольку длительное воздействие цитокининов, входящих в состав питательных сред, вызывает аномалии в морфологии стебля, потерю способности побегов к укоренению, иногда — гибель растений. В опытах с размножением земляники было показано, что при клонировании необходимо чередовать 2 — 3 цикла получения побегов с их укоренением.

*Второй способ* — индукция развития адвентивных почек, т. е. почек, возникающих из растительных клеток и тканей, которые их обычно не образуют. Этот метод в значительной мере обусловлен тотипотентностью клеток. Почти любой орган или ткань растения, свободные от инфекции, могут быть использованы в качестве экспланта и в определенных условиях образуют адвентивные почки. Данный процесс вызывают внесением в питательную среду определенных концентраций цитокининов и ауксинов, причем цитокинина должно быть гораздо больше, чем ауксина. Это наиболее распространенный способ микроразмножения высших растений. Развивая адвентивные почки на апикальных и пазушных меристемах, размножают растения томата, лука, чеснока; на сегментах листовых пластинок — салат, гloxсину, фиалки; на тканях донца луковиц — лук, чеснок, гладиолусы, тюльпаны и другие луковичные растения.

*Третий способ* — микрочеренкование побега, сохраняющего апикальное доминирование. Растения-регенеранты, полученные любым другим способом, можно черенковать в стерильных условиях, высаживать на свежую питательную среду, укоренять и адаптировать к полевым условиям либо снова подвергать микрочеренкованию для того, чтобы увеличить количество посадочного материала.

*Четвертый способ* — размножение в биореакторах микроклубнями. Это один из способов ускоренного размножения оздоровленного материала. О. Мелик-Саркисов (1984) сконструировал гидропонную установку, позволяющую получать около 7 000 микроклубней с 1 м<sup>2</sup> при массе одного клубня 5 г. Предусмотрена последующая механизированная посадка их в грунт. В отделе биологии клетки и биотехнологии Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН создана эффективная полупромышленная замкнутая система пневмоимпульсного биореактора для получения микроклубней картофеля, в которой предусмотрена возможность воздействия на направление и скорость процессов клубне-

образования. Технологии клонального микроразмножения в биореакторах разработаны не только для сельскохозяйственных, но и для декоративных растений (лилии, гладиолусы, гиацинты, филодендроны и т. д.). Однако созданные установки пока носят лабораторный, модельный характер.

**Пятый способ** — образование соматических зародышей — основан на морфогенных изменениях — соматическом эмбриогенезе. Впервые это явление было отмечено в середине 50-х годов XX в. в культуре клеток моркови. Формирование эмбриоидов в культуре осуществляется в два этапа. На первом этапе соматические клетки дифференцируются в эмбриональные в присутствии в питательной среде ауксинов, обычно это 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-D). На втором этапе развиваются эмбриоиды. Этот процесс идет только при значительном снижении концентрации ауксина или полном отсутствии его в питательной среде. Соматический эмбриогенез может происходить в тканях первичного экспланта, в каллусной и суспензионной культурах.

Поскольку соматические зародыши представляют собой полностью сформированные растения, данный метод позволяет сократить затраты, связанные с подбором условий укоренения и адаптации растений-регенерантов. Кроме того, преимущество получения соматических эмбриоидов состоит в том, что при использовании соответствующей техники капсулирования из них можно получать искусственные семена.

Соматический эмбриогенез в настоящее время применяют для размножения пшеницы, ячменя, моркови, редиса, винограда, некоторых древесных растений (дуб, ель, эвкалипт).

**Факторы, влияющие на клональное микроразмножение.**

**Питательная среда.** Состав питательной среды — один из наиболее важных факторов при микроразмножении. Обычно используют стандартные среды: Мурасиге и Скута, Нича и другие, но с добавлением на каждом этапе различных веществ. На первом этапе в питательную среду часто вносят антиоксиданты, чтобы предотвратить гибель клеток из-за активизации гидролитических ферментов. Особое значение имеют концентрация и соотношение фитогормонов в среде. Например, на втором этапе для усиления морфогенеза обычно добавляют цитокинины. Напротив, на третьем этапе при укоренении в питательной среде должно быть только небольшое количество ауксинов (либо используется безгормональная среда). Иногда в среду добавляют гиббереллин (ГК), который стимулирует рост сформировавшихся почек. Важным регуляторным фактором служит сахароза. Обычная концентрация ее в среде составляет 3 %. На растениях каперса было показано, что более высокая концентрация сахарозы в среде приводила к об-



разованию пурпурных, содержащих антоциан, почек возобновления. При концентрациях сахарозы менее 3 % наблюдалось формирование зеленых почек, способных к размножению.

Кроме того, существенное значение имеет состояние среды. Например, культивирование меристем земляники, вишни, черной смородины лучше происходит в жидкой питательной среде, чем в агаризованной.

**Состояние экспланта.** Морфогенез в значительной мере определяется возрастом и размером экспланта. Так, у эхеверии экспланты из молодых листьев образуют корни, из старых листьев — побеги. И только у листьев среднего возраста возникают и побеги, и корни, т. е. появляется возможность регенерации целого растения. Размер экспланта прямо пропорционально связан с регенерационной способностью: чем крупнее эксплант, тем выше эта способность. Большие экспланты могут самопроизвольно независимо от соотношения в питательной среде ауксинов и цитокининов образовывать почки. Но увеличение размера может привести к негативным последствиям, так как появляется вероятность присутствия в экспланте клеток, содержащих вирусную, грибковую и другие виды инфекции. Оптимальная величина экспланта должна обеспечивать как активный морфогенез, так и полную стерильность.

На регенерационную способность экспланта влияют также физиологическое состояние и таксономическая принадлежность растения-донора. Например, экспланты, выделенные из растений в фазу покоя, обладают более низкой способностью к укоренению и развитию побегов по сравнению с эксплантами, изолированными в фазу активного роста. Двудольные травянистые растения характеризуются большей регенерационной способностью, чем одnodольные.

**Физические факторы.** Большое значение для успешного клонального размножения имеют температура, условия освещения, качество света, влажность.

Для улучшения клонального микроразмножения физические факторы необходимо подбирать с учетом естественного ареала произрастания культивируемого растения. Так, для тропических растений оптимальная температура культивирования будет приближаться к 27 °С, для растений альпийских лугов — к 18—20 °С, для большинства растений — к 25 °С. Жизнеспособность эксплантов увеличивается, если в начале выращивания поддерживать более низкие температуры. Оптимальная интенсивность освещения для большинства растений составляет 1 000—3 000 лк в течение 14—16 ч в сутки.

Существенное значение для регуляции морфогенеза имеет качество света. У микрочеренков березы красный свет способ-

ствовал 100 %-му укоренению, а синий — увеличивал содержание ЦК в тканях растений и таким образом стимулировал образование побегов.

Относительная влажность в камерах, где растут пробирочные растения, поддерживается на уровне 65 — 75 %. При пересадке в почву эти растения нуждаются в повышенной влажности, что при выращивании в камерах достигается созданием атмосферы «тумана».

**Оздоровление посадочного материала.** Этот процесс начинается с момента стерилизации экспланта в асептических условиях бокса, с обработки ткани антибиотиками. Однако таким образом удастся освободиться главным образом от бактерий, грибных инфекций, нематод. Вирусы, вироиды, микоплазмы остаются в тканях инфицированных растений. Именно из-за вирусных болезней погибает от 10 до 50 % урожая сельскохозяйственных культур, размножающихся вегетативно. Некоторые бобовые растения (соя) могут передавать вирусы даже при семенном размножении.

В 1949 г. было выяснено, что клетки меристематических тканей растений обычно не содержат вирусов. В 1952 г. Дж. Морель и Г. Мартин предложили, используя культивирование меристем, получать здоровые, избавленные от вирусной инфекции растения. Они обнаружили, что при выращивании верхушки побега, состоящей из конуса нарастания и 2 — 3 листовых зачатков, на ней образуются сферические образования — протокормы. Протокормы можно делить, и каждую часть культивировать до образования корней и листовых примордиев, получая в большом количестве генетически однородные безвирусные растения. В настоящий момент культивирование меристем побега — наиболее эффективный способ оздоровления растительного материала от вирусов, вироидов и микоплазм. Однако при этом способе требуется соблюдать определенные правила. Как уже говорилось, чем меньше размер меристематического экспланта, тем труднее вызвать в нем морфогенез. Чем больше размер экспланта, тем легче идет морфогенез, в результате которого получается целое растение, но тем больше вероятность присутствия вирусов в экспланте. У многих видов и сортов растений зона, свободная от вирусных частиц, различна. Так, при клонировании апикальной меристемы картофеля размером 0,2 мм (конус нарастания с одним листовым зачатком) 70 % полученных растений были свободны от Y-вируса картофеля, но только 10 % — от X-вируса. В некоторых случаях не удастся найти оптимальное соотношение между размером меристематического экспланта и морфогенезом в нем, и при этом избавиться от вирусной инфекции. Приходится дополнять метод культуры меристем термо- или(и) хемитерапией. Так, предвари-

тельная термотерапия исходных растений позволяет получать свободные от вирусов растения-регенеранты из меристемных эксплантов размером от 0,3 мм до 0,8 мм. Вместе с тем этот прием может вызвать отставание растений в росте, деформацию органов, увеличение латентных (скрытых) инфекций.

Хорошие результаты дает совместное применение метода культуры тканей и хемотерапии. При внесении в питательную среду препарата «Вирозол» (1-рибофуранозил-1,2,4-триазолкарбоксамид) количество безвирусных растений увеличивается до 80—100 %.

В настоящее время для диагностики вирусных растений используют иммуноферментную технику, моноклональные антитела, метод молекулярной гибридизации меченых фрагментов РНК- и ДНК-вирионов и вирусов с вирусами тестируемого объекта. Эти методы очень чувствительны, но трудоемки и дорогостоящи.

После оздоровления с помощью вышеперечисленных технологий нормальные растения-регенеранты размножают обычными методами клонального микроразмножения. Для некоторых растений, например цитрусовых, получить морфогенез из меристем малого размера не удастся, поэтому требуется разработка оригинальных методов. Лимоны и апельсины оздоравливают и размножают, используя прививки меристем размером 0,14—0,18 мм на пробирочные подвои, полученные из семян. Достоинство такого подхода состоит и в том, что развивающиеся из меристем побеги не имеют ювенильных признаков, при этом цветение и плодоношение ускоряются.

## **7.2. КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ЖИВОТНЫХ**

### **7.2.1. Краткая история предмета**

Попытки сохранения жизнеспособности животных клеток и их выращивания в питательной среде были предприняты еще в конце XIX в. В 1885 г. исследователь У. Роукс сохранял в жизнеспособном состоянии в теплом физиологическом растворе хорионлантоисную оболочку куриного эмбриона. В 1897 г. Б. Лозе установил, что клетки крови и соединительной ткани способны выживать в пробирках с сывороткой и плазмой крови. На той же среде ученый культивировал фрагменты печени, почек, щитовидной железы. Льюнгрен в 1898 г. установил, что в кислой среде экспланты кожи человека можно не только поддерживать в жизнеспособном состоянии, но и сохранять их способность к ре-

имплантации. В 1907 г. Р. Харрисон усовершенствовал метод «ви-сячей капли». Благодаря этому в течение нескольких недель в капле лимфы лягушки сохранялись в жизнеспособном состоянии клетки зачатка нервной системы зародыша лягушки, которые к тому же образовывали нервные волокна. Скорость роста этих клеток составляла 20 мкм за 25 мин. В 1910 г. методика, разработанная Р. Харрисоном, была модифицирована и применена У. Барроузом для выращивания клеток тканей теплокровных животных.

Большой интерес вызвали в 1912 г. работы французского хирурга А. Каррела по созданию культуры «бессмертных» клеток сердца куриного эмбриона. Однако воспроизвести этот результат современники ученого не смогли. Владея хирургической техникой, Каррел при отсутствии антибиотиков сумел усовершенствовать методы создания стерильных условий при пересадке клеток. В 1913 г. он применил новую питательную среду — плазму крови, обогащенную экстрактом эмбриона, которая ускоряла рост ткани в культуре. Наконец, в 1923 г. ученый создал специальный сосуд для культивирования клеток, который получил его имя — колба Каррела. Однако первые попытки длительного культивирования за счет периодического пересаживания клеток в свежую среду были неудачными. Оказалось, что культуры клеток и тканей животных даже при пассировании (пересаживании) имеют ограниченную продолжительность жизни. Примерно после 50 пассажей они стареют и погибают. Исключение составляют опухолевые клетки и клетки с аномальным количеством хромосом. В 1951 г. была создана первая линия опухолевых клеток человека, которую сейчас используют во всех лабораториях мира под названием Hela. В этих клетках содержится 60—70 хромосом вместо обычных 46.

Культуры клеток и тканей нашли широкое применение в вирусологии. Они используются в качестве субстрата для выращивания вирусов в целях изучения последних, а также для получения противовирусных вакцин. Первые удачные эксперименты по получению большого количества вируса оспы крупного рогатого скота были проведены А. Каррелом, У. Риверсом (1927) и Т. Мейтландсом (1928).

Параллельно с совершенствованием методов культивирования клеток и тканей появились важные разработки, позволяющие проводить наблюдения за исследуемыми объектами. В 1928 г. А. Канти создал метод кинематографии, с помощью которого появилась возможность фото- и киносъемок роста и развития клеток. Была разработана методика трипсинизации — получения индивидуальных клеток. Получение клонов из одной клетки впервые было осуществлено Г. Эрлом с сотрудниками в 1948 г.

Однако основной проблемой культивирования клеток и тканей животных в то время было точное воспроизведение условий выращивания для получения стабильных результатов. Главным препятствием для этого было создание питательной среды с постоянным составом.

### 7.2.2. Питательные среды

До середины XX в. питательными средами для выращивания клеток служили природные материалы, которые обладают значительной индивидуальностью (лимфа крови, куриный желток и т.д.), что существенно снижало повторяемость результатов. В 1955 г. Игл разработал первый состав стандартной питательной среды (среда Игла), которая позволяла получать воспроизводимые результаты. Она содержит минеральные соли, аминокислоты, витамины, антибиотики, телячью сыворотку, краситель феноловый красный в качестве индикатора pH. Для выращивания животных клеток pH питательной среды служит одним из важнейших факторов, значения которого должны находиться в пределах 7,2 — 7,4. Поэтому солевые растворы, которые являются основой питательных сред, служат, кроме того, еще и буферными системами, поддерживающими постоянство кислотно-щелочного баланса. Например, для клонального роста диплоидных фибробластов человека W138 оптимальные показатели pH —  $7,30 \pm 0,15$ ; а для фибробластов из эмбриона цыпленка pH —  $7,12 \pm 0,18$ .

Особое значение среди компонентов питательных сред имеет сыворотка, которая выполняет несколько функций. За счет содержащихся в ней компонентов обеспечиваются прикрепление клеток к субстрату и их распластывание на нем, транспорт минеральных и органических веществ, стимулирование роста и деления клеток. За усиление деления клеток отвечают специфические вещества — митогены. Для животных клеток роль митогенов выполняют такие вещества, как фитогемагглютинин (ФГА), лектины. Очень важна концентрация питательных веществ и факторов роста. Было выяснено, что после протекания питательной среды над клетками следующая группа клеток, которую омоет эта среда, будет делиться хуже, чем клетки, которые омывает среда, протекавшая над свободными от клеток участками колбы. Следовательно, вторая группа клеток будет испытывать недостаток в питательных веществах и факторе роста, которые используют первые клетки. Фактор роста присутствует в среде в ничтожных количествах ( $10^{-10}$  М), и клетки конкурируют за него, что предотвращает неограниченный рост культуры клеток.

Сейчас разработаны модификации среды Игла и другие среды. Созданы среды, которые не содержат сыворотки, что увеличивает воспроизводимость полученных данных. Эти среды предназначены для выращивания определенных типов клеток. Примером могут служить среда Дубелько DME и DMEM (двойная модификация среды Игла), среда Искова IMDM (представляет собой модификацию среды Дубелько). Первую среду используют для культивирования нетрансформированных клеток и гибридом, вторую — для культивирования лимфоцитов и кроветворных клеток.

### **7.2.3. Источники получения тканей**

Для получения культур тканей обычно используют эмбрионы или организмы взрослых животных. Все ткани, полученные от животных в постнатальном периоде, могут рассматриваться как зрелые. Материал, полученный из взрослых животных, необходимо подвергнуть специальной обработке, чтобы обеспечить его стерильность перед культивированием. Обработка обычно заключается в применении антибиотиков и фунгицидных препаратов. Опухолевые ткани, изолированные из органов взрослых животных, ведут себя во многом как нормальные зрелые ткани, отличаясь от последних более быстрым ростом в течение первых дней культивирования. Эмбриональные ткани стерильны, поэтому, чтобы получить стерильный материал, достаточно вести работу в асептических условиях.

Эмбриональные и взрослые ткани животных могут быть получены из разных источников. Наиболее доступны эмбриональные ткани цыпленка, мыши, крысы. Среди взрослых тканей классическими объектами для культивирования служат центральная нервная система, подкожные фибробласты, костный мозг.

### **7.2.4. Типы культур клеток и тканей**

У животных различают культуру клеток и культуру тканей. В культуре тканей выращивают сообщества связанных между собой клеток, которые находятся в непосредственном контакте между собой. В культуре клеток одиночные клетки растут, образуя клоны. Рассмотрим основные типы культур клеток.

1. *Первичная культура* — небольшая популяция свежeweделенных клеток, полученных из органа взрослого животного организма. Для ее приготовления кусочки ткани органа обрабатыва-

ют трипсином, который разрушает ткань с образованием отдельных клеток. Клетки переносят на питательную среду. Время их жизни ограничено 2 — 3 неделями. В первичной культуре клетки, как правило, гетерогенны и характеризуются низкой пролиферацией. Многие зрелые ткани в культуре растут с большим трудом, и проходит несколько дней, прежде чем рост становится заметным. Так, изолированные фибробласты растут очень слабо. Однако другие типы клеток, например эпителиальные клетки зрелых тканей, развиваются в культуре хорошо.

Развитие клеток при пассировании, которое обеспечивает продолжение жизни и сохранение свойств клеток, получение более однородных популяций, клонирование и исследование клетки, может идти в двух направлениях. После нескольких пересевов клеточная линия может погибнуть или превратиться в постоянную клеточную линию. Нормальные клетки, превращаясь в постоянную линию, не становятся злокачественными. Обнаружить появление постоянной линии клеток можно по ряду морфологических и физиологических признаков (уменьшение размера, округление, увеличение ядерно-плазменного отношения, снижение времени удвоения клеток в культуре и т.д.).

2. *Диплоидная культура* — культура клеток, источником которых являются эмбриональные ткани человека и животных. Эта культура растет на питательной среде дольше — примерно 2 месяца. Характерной чертой диплоидных культур является постоянство их биологических свойств, например диплоидного набора хромосом. Клетки сохраняются без изменений в течение приблизительно 50 пассажей. Культуры, выращенные из эмбриональных тканей, отличаются лучшей выживаемостью, более активным ростом, легче поддаются выращиванию, быстрее мигрируют по сравнению с соответствующими тканями, выделенными из взрослых организмов. Это объясняется низким уровнем дифференцировки эмбриональных тканей и присутствием в них клеток-предшественников. Дифференцировка нормальных клеток в культуре сопровождается обычно полным прекращением пролиферации клеток.

3. *Стабильная (перевиваемая) культура* — культура опухолевых клеток и клеток с аномальным числом хромосом. Размножение этих культур ничем не ограничено. Даже при частичной дифференцировке, которая возможна в культурах опухолевых клеток, их способность к делению сохраняется. Они полностью адаптированы к существованию вне организма.

Культуры клеток лишены структурной организации, не взаимодействуют между собой и восстановить эти взаимодействия достаточно трудно, так же трудно, как контролировать изменения свойств культивируемых клеток. В связи с этим в фундаменталь-

ных исследованиях часто отдают предпочтение культурам тканей, клеточным системам, которые сохраняют структурную организацию ткани.

Культура тканей или органов (органный культура) характеризуется сохранением взаимосвязей между клетками, и в этом ее принципиальное отличие от культуры клеток. Все биохимические, физиологические, морфологические процессы в данной культуре приближены к тем, которые происходят в целом организме. Наибольшее сходство отмечено у эмбриональных тканей. Недостаток культур тканей состоит в том, что они не способны к размножению.

### 7.2.5. Способы и условия культивирования

**Культура клеток.** Для культивирования животных клеток используют *непроточные культуры* и *проточные культуры*. Непроточные культуры характеризуются тем, что клетки выращиваются в постоянном объеме питательной среды. Со временем изменяется состав этой среды, что требует ее периодической замены. Проточные культуры характеризуются добавлением новой питательной среды с одновременным удалением равного объема отработанной. Этот способ культивирования применяют для выращивания суспензионных культур и монослойных культур на микроносителях. Среда с питательными веществами постоянно обновляется, что позволяет поддерживать неизменный состав и концентрацию питательных веществ, количество клеток в культуре, а также выводить продукты их жизнедеятельности.

Существуют два типа клеточных культур: *монослойные культуры* и *суспензионные культуры*.

Монослойные культуры образуются в результате пролиферации прикрепленных клеток. Частота деления клеток в культуре возрастает с увеличением степени их прикрепления и расплывания на поверхности субстрата. В суспензии клетки не прикреплены к твердой поверхности, имеют округлую форму, делятся очень плохо либо почти никогда не делятся. Вероятно, распластанные на субстрате клетки вследствие увеличения своей удельной поверхности могут поглощать питательные вещества и фактор роста с большей интенсивностью. Деление клетки зависит и от возможности ее вступать в контакт с субстратом, как бы ни мала была площадь этого контакта. Такие точечные контакты не дают клетке возможности распластаться, но служат местами взаимодействия внутриклеточных актиновых филаментов с субстратом. При выращивании в культуре клетки одного типа ткани характеризуются согласованной скоростью деления для поддержа-



ния определенной плотности популяции, так же как это наблюдается в тканях целого организма. На поверхности питательных сред эпителиальные клетки, или фибробласты, «приклеиваются» к ней, распластываются и делятся до тех пор, пока не образуют сплошной монослой.

1. Монослойные культуры характеризуются рядом особенностей:

- легкое манипулирование культурой (промывание клеток, замена питательной среды и т.д.);
- создание культуры на основе любого типа клеток;
- создание высокой плотности клеток, увеличение выхода необходимого продукта их жизнедеятельности и т.д.

2. Суспензионные культуры удобны для получения метаболитов и увеличения выхода клеток.

**Культура тканей.** Существует несколько методов культивирования животных тканей.

1. Метод, известный под названием «техника часового стекла», был предложен Феллом и Робинсоном в 1929 г. В качестве субстрата для культивирования обычно используют сгусток плазмы крови цыпленка с добавлением эмбрионального экстракта кур. Часовое стекло с культурой во избежание высыхания помещают в замкнутое пространство (чашка Петри), а затем в термостат при температуре 37,5°C. Это классический метод для морфогенетического анализа эмбриональных органов. Однако он обладает несколькими недостатками. Во-первых, сложный состав питательной среды затрудняет проведение биохимических исследований. Во-вторых, при культивировании питательная среда разжижается, в результате чего тканевой эксплант оказывается в растворе, что мешает нормальному росту тканей, органов или их фрагментов.

Следующие два метода позволяют успешно решить данную проблему.

2. Технология выращивания культуры тканей на плотной агаризованной среде была предложена Спраттом. Основой для таких сред служат жидкие питательные среды определенного состава, солевые растворы с добавлением агара в концентрации от 1 до 4 %.

3. Троувелл предложил другой подход к решению проблемы — выращивание тканей и органов на поверхности металлической сетки. Края сетки загибают по углам как ножки столика, после чего его погружают в питательную среду так, чтобы поверхность сетки была вровень или чуть выше поверхности питательной среды. При культивировании мягких тканей на сетку укладывают кусочки миллиметровых фильтров, а уже затем ткани. По технологии этот метод похож на методы «кормящего слоя» и «кондиционирования среды» для культивирования одиночных клеток растений.

## **7.2.6. Использование культур клеток и тканей животных**

Культуры клеток и тканей служат прекрасным объектом для фундаментальных общебиологических и медико-биологических исследований. С помощью культур клеток можно изучать процессы наследования генов, регуляцию их активности, процессы клеточной дифференцировки. Культуры клеток позволяют исследовать действие на клетку физических, химических и биологических факторов. Широкое применение получили культуры фибробластов при изучении диагностики и патогенеза некоторых заболеваний, в том числе наследственных. Культуры тканей используют для таких исследований как, взаимоотношения клеток в тканях и самих тканей, дифференцировка клеток, закономерности размножения клеток, их трансформации. Культуры органов применяют для изучения закономерностей развития зачатков в норме и при различных воздействиях.

Большое практическое значение культуры клеток, в частности культуры клеток беспозвоночных, имеют в вирусологии, где они используются для диагностики вирусов, а также служат субстратом для получения живых противовирусных вакцин.

## КРИОКОНСЕРВАЦИЯ

Сохранение разнообразия форм жизни — важнейшая проблема, с которой столкнулось современное человечество. Еще Г. Ф. Гаузе доказал, что устойчивость сообщества тем выше, чем больше число составляющих его видов. Следовательно, сохранение биоразнообразия — один из важнейших механизмов стабильности жизни на Земле. Кроме того, для обеспечения питанием растущей численности населения нашей планеты необходимо выведение новых, более продуктивных сортов сельскохозяйственных растений, а для успешной селекции важен постоянный приток генов из новых источников. Традиционным источником генетического материала служат дикие виды растений. Однако в связи с увеличением числа городов, расширением сельскохозяйственных угодий, вырубкой лесов, ухудшением экологии эти виды постепенно вытесняются, а многие из них находятся на грани вымирания, поэтому их необходимо сохранить.

### 8.1. СПОСОБЫ СОХРАНЕНИЯ ГЕНОФОНДА

Существует несколько способов сохранения генофонда живых организмов: заповедники, национальные парки, зоопарки. Заповедники и национальные парки — наиболее совершенная форма резерватов. Основной недостаток этих формирований состоит в том, что они требуют значительных территорий. Для сохранения 90 — 95 % существующих видов живых организмов территория заповедников должна занимать около 30 % всей площади суши, отдать которые при современной плотности населения и потребности в сельскохозяйственных угодьях просто невозможно. Зоопарки и питомники требуют меньших территорий. Однако вернуть выращенных там животных в дикую природу удастся достаточно редко. В последнее время большое внимание уделяется созданию и развитию новых способов: пересадочных коллекций каллусных клеток, депонированию культур клеток и, наконец, криосохранению, т.е. хранению объектов при очень низкой температуре, обычно это температура жидкого азота ( $-196^{\circ}\text{C}$ ).

Однако современное понятие «криоконсервация» несколько расплывчато из-за разнообразия объектов, каждый из которых требует своих температур и условий хранения. Этот метод позволяет сохранять соматические и половые клетки, семена растений, эмбрионы и личинки животных. Разработаны технологии длительного сохранения с помощью криоконсервации генетического материала разных объектов: грибов, споровых растений, высших растений, некоторых млекопитающих, птиц, амфибий, рыб, иглокожих, моллюсков, насекомых, ракообразных.

Криосохранение имеет существенные преимущества по сравнению с остальными методами. При сохранении в глубоко замороженном состоянии полностью прекращается обмен веществ, отсутствуют значительные физико-химические молекулярные изменения не только в клетке, но и в окружающей водной среде. Таким образом, сохраняется генофонд, а следовательно, все свойства замороженного объекта.

В 1992 г. в Рио-де-Жанейро большинством государств мира была принята Международная конвенция по сохранению биологического разнообразия, созданы Национальные программы по сохранению природных генетических ресурсов. Одно из обязательных условий этих программ — создание банков зародышевой плазмы: семян, меристем, пыльцы, зародышей, культур тканей, клеток и другого генетического материала. Такие банки долговременного хранения геномов позволяют:

- собирать и сохранять редкие и исчезающие виды;
- сохранять морфологическое, физиологическое и адаптационное разнообразие внутривидовой изменчивости по культурным и дикорастущим видам;
- служить незаменимыми источниками материала для селекции культурных растений;
- обеспечивать размножение редких и исчезающих видов дикорастущих растений и возвращение их в природу;
- создавать искусственные популяции и фитоценозы.

## **8.2. КРИОКОНСЕРВАЦИЯ СЕМЯН РАСТЕНИЙ**

Семена всех растений в зависимости от продолжительности их жизни делят на три группы:

- 1) микробиотики, сохраняющие жизнеспособность до 3 лет;
- 2) мезобиотики — от 3 до 15 лет;
- 3) макробиотики — от 15 лет и более.

Для продления жизни семян разработано достаточно много технологий. В первую очередь это касается семян культурных растений. Время их жизни увеличивают благодаря снижению тем-

температуры хранения (низкие положительные температуры), снижению влажности окружающей среды, герметизации при хранении, применению искусственных газовых сред и, наконец, криосохранению. Очень важно разработать технологии длительного хранения семян, относящихся к группе микробиотиков, среди которых немало хозяйственно важных (цитрусовые), декоративных (каштан, гербера) и лекарственных (дуб, каштан) растений.

В настоящее время для продления жизни семян любых растений чаще всего применяют хранение при пониженных температурах:

- 1) низкие положительные температуры ( $4 \pm 1^\circ\text{C}$ );
- 2) неглубокое замораживание (от  $-10$  до  $-20^\circ\text{C}$ );
- 3) глубокое замораживание (криоконсервация) в жидком азоте при температуре  $-196^\circ\text{C}$  или в парах над ним  $-160^\circ\text{C}$ .

Семена и некоторые другие элементы зародышевой плазмы хранят, используя в большей или меньшей степени все три температурных режима, в специализированных банках, сеть которых за последнее время сильно увеличилась. Если в середине 70-х годов XX в. таких банков насчитывалось немногим более 50, то сейчас их более 1 300. В банках хранится более 6 млн образцов: 48 % — новые сорта и селекционные линии; 30 % — старые сорта; 15 % — дикорастущие родичи культурных растений и сорные виды. Например, в Швейцарии, в 24 государственных и частных банках сохранено 17 тыс. образцов семян кормовых, плодовых, лекарственных и ароматических растений. Большое внимание сбору и хранению лекарственных растений уделяют в Австрии и Китае. Создаются специализированные банки зародышевой плазмы по древесным видам.

Самым дешевым и экологически безопасным было признано хранение семян в шахтах в вечной мерзлоте. Такие эксперименты проводились в Якутске в подземной лаборатории Института мерзлотоведения Сибирского отделения РАН. Хранение в герметичных сосудах в течение трех лет семян пшеницы, ячменя, овса, ржи, овощных растений, кормовых трав при температуре  $-2,7^\circ\text{C}$  не снижало их жизнеспособности. Однако вечная мерзлота есть не везде, поэтому глубокое замораживание и замораживание до сверхнизких температур ( $-200^\circ\text{C}$  и ниже) удобнее всего в техническом отношении. Кроме того, при этих температурах практически прекращаются все метаболические процессы, что позволяет хранить растительный материал очень долго без существенных изменений. Сейчас изучена всхожесть семян после глубокого замораживания у более чем 400 видов растений, и уже эти результаты показывают, что устойчивость семян к низким и сверхнизким температурам видоспецифична, а также может зависеть от времени и места сбора. Разные растения неодинаково реагируют

на температурный фактор. Только недавно удалось добиться успешного криосохранения семян шести форм наземных и эпифитных тропических орхидей, что открывает возможность создания криобанка семян этих исчезающих растений (Т. В. Никишина и др., 2001). Криоконсервация семян некоторых культурных бобовых растений рекомендуется для повышения их всхожести. Глубокое замораживание семян вишни и черешни запатентовано как способ их длительного хранения. Реакция на низкие температуры у представителей семейства лилейных немного различалась: у ландыша после криосохранения увеличивалась частота хромосомных aberrаций и снижалась жизнеспособность; у семян растений рода купена жизнеспособность также снижалась, но частота хромосомных aberrаций не изменялась. У некоторых растений повышение частоты хромосомных aberrаций наблюдалось даже при неглубоком замораживании. Семена таких растений, как жимолость, пиретрум, золотарник обыкновенный, частично погибают при любом замораживании (В. Л. Тихонова, 1999). Поэтому перед внедрением криоконсервации необходимо проводить всесторонние исследования ее всевозможных последствий, так как они могут быть весьма разнообразны.

### 8.3. КРИОКОНСЕРВАЦИЯ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ

Сущность метода криосохранения сводится к замораживанию специально подготовленных растительных клеток при использовании криопротекторов — веществ, ослабляющих повреждения клеток при замораживании и оттаивании. В настоящее время известны два метода криосохранения: *программное (медленное)* и *сверхбыстрое замораживание*. Программное замораживание изучалось уже давно, поэтому оно довольно широко применяется для сохранения животных и растительных клеток. Разработка сверхбыстрого замораживания началась сравнительно недавно, однако считается, что именно этот метод со временем станет наиболее перспективным.

Трудности криосохранения растений связаны со спецификой растительных клеток. Клетки растений имеют большие размеры (в культуре тканей они изменяются от 15 до 1 000 мкм), прочную целлюлозную стенку и вакуоли. Причем именно степень вакуолизации играет основную роль в устойчивости клеток к действию низких температур. В зрелой клетке центральная вакуоль занимает до 90 % общего объема клетки, т. е. клетка представляет собой как бы резервуар с водой, которая необходима для ее нормальной жизнедеятельности. Поэтому основные факторы, способные привести клетку к гибели при замораживании, — это об-

разование льда и дегидратация. Обычно кристаллы льда сначала образуются во внешнем растворе вокруг клеток. Максимальная скорость их роста в зависимости от состава раствора находится в пределах температур от  $-20$  до  $-60^{\circ}\text{C}$ . При температуре  $-140^{\circ}\text{C}$  рост кристаллов льда совершенно прекращается. Следовательно, и при замораживании, и при оттаивании клеткам очень важно с оптимальной скоростью «проскочить» температуру образования льда. Кристаллы внеклеточного льда могут механически разрушать клетки. Кроме того, они играют водоотнимающую роль, что приводит к значительной дегидратации клетки и возможной ее гибели от осмотического стресса. При очень быстром замораживании лед может образовываться и внутри клеток, что ведет к разрушению в ней многочисленных мембран.

Избежать кристаллизации льда помогла бы *витрификация воды*, т.е. затверждение ее в аморфном состоянии. Получить витрификацию чистой воды практически невозможно. Но в коллоидных растворах скорость образования центров кристаллизации и роста кристаллов льда снижается и повышается температура, при которой их рост прекращается. Все это облегчает витрификацию. Добавление криопротекторов также затрудняет кристаллизацию льда и способствует витрификации.

Наиболее известны такие *криопротекторы*, как диметилсульфоксид (ДМСО), различные сахара, глицерин, этиленгликоль и их производные. Действие криопротекторов состоит в снижении количества свободной воды, повышении вязкости раствора. Все криопротекторы делят на две группы: проникающие и непроникающие. Это разделение достаточно условно. Так, глицерин — первое вещество, определенное как криопротектор, может проникать в клетку, если его добавлять при комнатной температуре, или выступать как непроникающее соединение, если его добавлять при температуре  $0^{\circ}\text{C}$ . Принято считать, что непроникающие криопротекторы специфически влияют на мембрану, повышая ее проницаемость. Применение сильных, проникающих в клетку криопротекторов ограничено их токсичностью. Обычно используют смеси криопротекторов, так как в них токсичность одного из веществ снижается за счет присутствия другого.

Жизнеспособность клеток после замораживания зависит не только от предупреждения образования льда, но и от их состояния. Крупные вакуолизированные клетки погибают гораздо чаще, чем мелкие меристемоидные. Поэтому на этапе подготовки культуры к замораживанию ее культивируют в условиях, способствующих образованию мелких клеток и синхронизации их деления. Кроме того, концентрирование клеток в культуре, т.е. увеличение ее плотности, способствует повышению выживаемости клеток после замораживания.

Таким образом, криосохранение достаточно надежно обеспечивает сохранение генофонда. Перспективность этого метода подтверждается возобновлением после хранения в жидком азоте суспензионных культур моркови, явора, кукурузы, риса, сахарного тростника; каллусных культур тополя, маршанции, сахарного тростника; андрогенных эмбриоидов — беладонны, табака и др. Из восстановленных после замораживания культур моркови и табака удалось регенерировать целые растения. После быстрого замораживания сохранили жизнеспособность меристемы земляники, малины, гвоздики, томатов, картофеля и ряда других растений. Однако для криосохранения требуется сложная работа по подбору условий, обеспечивающих выживание клеток и, следовательно, возможность последующей регенерации из них целых растений. Необходимо учитывать генетические и морфофизиологические особенности клеток, способность к закаливанию, уровень проницаемости клеточных мембран, подбор криопротекторов, скорость снижения температуры при замораживании, условия оттаивания.



Круг вопросов, к решению которых привлекают биотехнологические методы и достижения, достаточно широк. Большинство из них прямо или косвенно связано с глобальными проблемами, стоящими перед современной цивилизацией, такими, как загрязнение окружающей среды, угроза экологического кризиса, истощение запасов полезных ископаемых, опасность мирового энергетического кризиса, нехватка продовольствия, борьба с болезнями.

Благодаря достижениям фундаментальных исследований в молекулярной биологии, биохимии, генетической инженерии и новейшим технологиям в биоиндустрии получают новые продукты заданного состава и качества, очищенные от экотоксикантов и обладающие не только питательной ценностью, но и профилактическими свойствами. Таким путем получена серия продуктов на основе сои, созданы бесхолестериновые и малохолестериновые спреда («намазки») типа «легкого» сливочного масла, а также безжировое мороженое.

Переработка растительной и микробной биомассы позволяет получать высококачественные белки, масла, пектиновые вещества, пищевые волокна, а также белок, сбалансированный по аминокислотному составу, и компоненты нуклеиновых кислот, необходимые для медицинской, пищевой, косметической и других отраслей промышленности.

Возникла новая научная дисциплина — *экологическая биотехнология*, осуществляющая новейший подход к охране и сохранению окружающей среды. Разработаны технологии рекультивации почвы, биологической очистки воды и воздуха и биосинтеза препаратов, компенсирующих вредное влияние измененной окружающей среды на людей и животных. Одна из важнейших задач биотехнологии — ограничение масштабов загрязнения нашей планеты промышленными, сельскохозяйственными и бытовыми отходами, токсичными компонентами автомобильных выхлопов. Современные научные исследования нацелены на создание безотходных технологий, на получение легкоразрушаемых полимеров, в том числе биогенного происхождения, а также на поиск новых

активных микроорганизмов — разрушителей полимеров (полиэтилена, полипропилена, полихлорвинила). Усилия биотехнологии направлены на борьбу с пестицидными загрязнениями — следствием неумеренного и нерационального применения ядохимикатов. Ведутся разработки технологий по утилизации вредных выбросов (химикалии, нефть), загрязняющих воду и почву, и сельскохозяйственных отходов типа молочной сыворотки для получения пищевых и кормовых белковых продуктов, в том числе специальных препаратов, обогащенных, например, селеном дрожжей.

Повышение цен на традиционные источники энергии (природный газ, нефть, уголь) и угроза их исчерпания побудили ученых обратиться к альтернативным путям получения энергии. Роль биотехнологии в создании экономичных возобновляемых энергетических источников (спиртов, биогенных углеводов, водорода) чрезвычайно велика. Эти экологически чистые виды топлива можно получать путем биоконверсии отходов промышленного и сельскохозяйственного производства. Перспективно продолжение исследований по усовершенствованию и внедрению процессов производства метана, этанола, созданию на основе микроорганизмов (и ферментов) элементов, эффективно производящих электричество, а также по организации искусственного фотосинтеза, в частности биофотоллиза воды, при котором можно получать богатые энергией водород и кислород.

Развитие сельскохозяйственной биотехнологии на современном этапе направлено на решение таких глобальных проблем, как повышение плодородия почв, урожайности и качества сельскохозяйственной продукции; рекультивация сельскохозяйственных угодий; улучшение экологической обстановки, способствующей восстановлению биоценоза почв; повышение качества кормов и др. В области медицины весьма перспективной является разработка новых технологий использования молекулярных антител в области диагностики и лечения заболеваний, направленного транспорта лекарственных средств, трансплантологии органов, тканей, клеток, формирования нового класса медицинской техники — индивидуальных биотехнологических систем для контроля состояния организма.

Особый интерес представляют принципиально новые направления, развитие которых предполагается осуществить в XXI в.: электрохемитерапия, молекулярное моделирование, отдельные области клеточной инженерии (клеточная инкапсуляция, энергетические межклеточные взаимодействия).

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

*Бирюков В. В.* Основы промышленной биотехнологии. — М. : Колос, 2004. — 296 с.

*Глик Б.* Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. — М. : Мир, 2002. — 589 с.

*Егорова Т. А.* Основы биотехнологии / Т. А. Егорова, С. М. Клунова, Е. А. Живухина. — М. : «Издательский центр «Академия», 2006. — 208 с.

*Жимулев И. Ф.* Общая и молекулярная генетика. — Новосибирск : Изд-во Сибирского университета, 2003. — 479 с.

*Квеситадзе Г. И.* Введение в биотехнологию / Г. И. Квеситадзе, А. М. Безбородов. — М. : Наука, 2002. — 256 с.

*Кузнецов А. Е.* Научные основы экобиотехнологии / А. Е. Кузнецов, Н. Б. Градова. — М. : Мир, 2006. — 504 с.

*Патрушев Л. И.* Искусственные генетические системы. — М. : Наука, 2004. — 284 с.

*Ройт А.* Основы иммунологии. — М. : Мир, 2000. — 82 с.

*Рыбчин В. Н.* Основы генетической инженерии. — СПб. : Изд-во СПбГТУ, 2002. — 522 с.

*Сазыкин Ю. О.* Биотехнология / Ю. О. Сазыкин, С. Н. Орехов, И. И. Чакалева. — М. : «Издательский центр «Академия», 2006. — 256 с.

Предисловие .....	3
Введение .....	4
<b>Глава 1. Биотехнологические процессы в пищевой промышленности (Т. А. Егорова) .....</b>	<b>7</b>
1.1. Производство кормового белка .....	7
1.2. Использование дрожжей и бактерий .....	10
1.3. Использование водорослей и микроскопических грибов .....	14
<b>Глава 2. Применение биотехнологических процессов для решения проблем окружающей среды (С. М. Клунова) .....</b>	<b>16</b>
2.1. Экологическая биотехнология и ее задачи .....	16
2.2. Биотрансформация ксенобиотиков и загрязняющих окружающую среду веществ .....	17
2.3. Получение экологически чистой энергии. Биогаз .....	21
2.4. Производство этанола .....	24
2.5. Биотехнология преобразования солнечной энергии .....	25
2.6. Фотопроизводство водорода .....	26
2.7. Очистка сточных вод .....	28
<b>Глава 3. Биотехнология производства метаболитов (С. М. Клунова) .....</b>	<b>32</b>
3.1. Механизмы интенсификации процессов получения продуктов клеточного метаболизма .....	33
3.2. Методология селекции мутантов с дефектами экспрессии генов и регуляции обмена веществ .....	39
3.3. Биотехнология получения первичных метаболитов .....	41
3.3.1. Производство аминокислот .....	41
3.3.2. Производство витаминов .....	56
3.3.3. Производство органических кислот .....	61
3.4. Биотехнология получения вторичных метаболитов .....	64
3.4.1. Получение антибиотиков .....	64
3.4.2. Получение промышленно важных стероидов .....	75

<b>Глава 4. Биоиндустрия ферментов (С. М. Клунова)</b>	77
4.1. Применение ферментов	77
4.2. Источники ферментов	82
4.3. Технология культивирования микроорганизмов — продуцентов ферментов	82
4.4. Технология выделения и очистки ферментных препаратов	85
4.5. Инженерная энзимология, ее задачи	91
4.6. Имобилизованные ферменты	92
4.6.1. Носители для иммобилизации ферментов	92
4.6.2. Методы иммобилизации ферментов	94
4.6.3. Иммобилизация клеток	100
4.6.4. Промышленные процессы с использованием иммобилизованных ферментов и клеток	101
4.6.5. Ферментативная конверсия целлюлозы в глюкозу	108
4.6.6. Биосенсоры на основе иммобилизованных ферментов	109
4.6.7. Имобилизованные ферменты в медицине	111
<b>Глава 5. Основы генетической инженерии (Т. А. Егорова, Е. А. Живухина)</b>	112
5.1. История развития генетической инженерии	112
5.2. Биотехнология рекомбинантных ДНК	114
5.3. Конструирование рекомбинантной ДНК	124
5.4. Экспрессия чужеродных генов	131
5.5. Клонирование и экспрессия генов в различных организмах	132
5.6. Генетическая инженерия в животноводстве	136
5.7. Получение инсулина на основе методов генетической инженерии	141
5.8. Синтез соматотропина	147
5.9. Получение интерферонов	149
5.10. Генетическая инженерия растений	154
5.10.1. Проблемы биобезопасности	154
5.10.2. Получение трансгенных растений	156
5.10.3. Применение методов генетической инженерии для улучшения аминокислотного состава запасных белков растений	163
5.10.4. Повышение эффективности процесса фотосинтеза	164
5.10.5. Генно-инженерные подходы к решению проблемы усвоения азота	165
5.10.6. Изменение качества плодов	167
5.10.7. Устойчивость растений к гербицидам	168

5.10.8. Устойчивость растений к фитопатогенам и насекомым .....	169
5.10.9. Устойчивость растений к абиотическим стрессам ....	170
5.11. Иммунобиотехнология .....	172
<b>Глава 6. Белковая инженерия (С. М. Клунова) .....</b>	<b>183</b>
6.1. Направленный мутагенез .....	184
6.2. Генетическая инженерия белков .....	188
<b>Глава 7. Основы клеточной инженерии (Е. А. Живухина) .....</b>	<b>194</b>
7.1. Клеточная инженерия растений .....	194
7.1.2. Методы и условия культивирования изолированных тканей и клеток растений .....	196
7.1.3. Дедифференцировка как основа каллусогенеза .....	201
7.1.4. Типы культуры клеток и тканей .....	202
7.1.5. Общая характеристика каллусных клеток .....	206
7.1.6. Морфогенез в культуре каллусных клеток как проявление тотипотентности растительной клетки .....	209
7.1.7. Изолированные протопласты, их получение и культивирование .....	213
7.1.8. Использование культур изолированных клеток и тканей .....	215
7.1.8.1. Синтез вторичных метаболитов .....	215
7.1.8.2. Биотехнологии в сельском хозяйстве .....	221
7.1.8.3. Клональное микроразмножение и оздоровление растений .....	230
7.2. Клеточная инженерия животных .....	237
7.2.1. Краткая история предмета .....	237
7.2.2. Питательные среды .....	239
7.2.3. Источники получения тканей .....	240
7.2.4. Типы культур клеток и тканей .....	240
7.2.5. Способы и условия культивирования .....	242
7.2.6. Использование культур клеток и тканей животных ...	244
<b>Глава 8. Криоконсервация (Е.А.Живухина) .....</b>	<b>245</b>
8.1. Способы сохранения генофонда .....	245
8.2. Криоконсервация семян растений .....	246
8.3. Криоконсервация клеток и тканей растений .....	248
<b>Заключение .....</b>	<b>251</b>
<b>Список литературы .....</b>	<b>253</b>