



Ведение в биотехнологию

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
ПОЛЕССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

В.Н. Никандров
Е.М. Волкова

ВВЕДЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИЮ

специальность
1-31 01 01 Биология (по направлениям)

Пояснительная записка
Конспект лекций
Литература
Вопросы к экзамену
Учебная программа дисциплины

Пинск
ПолесГУ
2021

Электронный
учебно-методический комплекс

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Курс «Введение в биотехнологию» предусматривает определение термина «биотехнология», содержание дисциплины и места биотехнологии в системе наук на современном этапе развития общества, ее взаимодействие с другими дисциплинами биологического, химического, инженерного и экономического профиля. Предусмотрен также анализ достижений биотехнологии и предполагаемых перспектив ее дальнейшего развития.

Биотехнология – одна из наиболее динамично развивающихся биологических дисциплин современности. Возникнув как чисто практическое приложение знаний, накопленных в микробиологии, биохимии, генетике, молекулярной биологии и других дисциплинах, биотехнология постоянно стимулирует развитие биологических и химико-технологических дисциплин. Строго говоря, биотехнология является горизонтальной дисциплиной, использующей методологию других дисциплин – микробиологии, биохимии и генетики, а также ряда их разделов, получивших развитие в последние десятилетия.

В силу этого диапазон процессов, являющихся в настоящее время объектами изучения и приложения биотехнологии, чрезвычайно широк. Он включает молекулярный уровень (конструирование рекомбинантных молекул и белковую инженерию), клеточный уровень (биосинтез биологически активных соединений), уровень организменный (трансгенные организмы), экосистемы (очистка и детоксикация объектов окружающей среды, повышение эффективности экосистем). Это выделяет биотехнологию как интегральную биологическую дисциплину. Наибольший практический интерес представляют процессы получения биологически активных соединений, используя биотехнологические объекты.

Не следует забывать также и о другой стороне использования биотехнологии – разработке бактериологического и биологического оружия.

Цель курса – сформировать у студентов представление об основных направлениях развития современной биотехнологии, путях и средствах решаемых ею проблем.

В задачи учебной дисциплины входит получение студентами знаний об основных объектах биотехнологии: энзимы, клетки про- и эукариот, их характеристика и область применения; о модельных и базовых объектах биотехнологии, типах и режимах ферментационных процессов; основных направлениях биотехнологии (в пищевой, легкой, фармацевтической промышленности, медицине, сельском хозяйстве и т.д.).

КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

СОДЕРЖАНИЕ

	ВВЕДЕНИЕ	5
1	МИКРООРГАНИЗМЫ – ОСНОВНЫЕ ОБЪЕКТЫ	
	БИОТЕХНОЛОГИИ.....	25
2	ТРАНСГЕННЫЕ ЖИВОТНЫЕ И РАСТЕНИЯ КАК НОВЫЕ	
	ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ	49
3	ДОСТИЖЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ В	
	ГЕНОТЕРАПИИ.....	80
4	ОСНОВНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К БИОРЕАКТОРАМ.....	102
5	ПРОИЗВОДСТВО ОДНОКЛЕТОЧНОГО БЕЛКА	115
6	ФЕРМЕНТНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ	125
7	ТРЕБОВАНИЯ К ПИТАТЕЛЬНЫМ СУБСТРАТАМ	131
8	ПРИРОДНЫЕ СЫРЬЕВЫЕ МАТЕРИАЛЫ	140
9	КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК	150
10	ТИПЫ И РЕЖИМЫ ФЕРМЕНТАЦИИ	160
11	ВЫДЕЛЕНИЕ И СЕЛЕКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ	172
12	ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ	182
13	БИОТЕХНОЛОГИЯ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ И	
	ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ	191
14	ВОЗМОЖНЫЕ РИСКИ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЙ	
	ДЕЯТЕЛЬНОСТИ	211
15	ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР	220
16	ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ЭНЗИМЫ	260
	Литература.....	265
	Учебная программа.....	267
	Тесты	288

ВВЕДЕНИЕ

На современном этапе жизни человечества одним из доминирующих направлений его деятельности все больше становится биотехнология.

Впервые термин «биотехнология» ввел венгерский инженер Кароль Эреки (1868–1952) в 1917 году при крупномасштабном производстве свинины с использованием в качестве корма сахарной свеклы вложив в термин следующее определение в книге «*Biotchnologie*» (Berlin, 1919): «биотехнология – это все виды работ, при которых из сырьевых материалов с помощью живых организмов производятся те или иные продукты».



Рисунок 1. - Венгерский инженер Кароль Эреки

Биотехнология ныне – дисциплина, изучающая возможности использования живых организмов (биохимическая деятельность микроорганизмов, изолированных клеток или их компонентов), их систем или продуктов их жизнедеятельности для решения технологических задач, а также возможности создания живых организмов с необходимыми свойствами методом геной инженерии. Это также комплексная, многопрофильная область научно-технического прогресса, включающая *микробиологический синтез в его широком понимании*, а также на современном этапе *генетическую и клеточную инженерии, инженерную энзимологию*.

В узком смысле биотехнология – совокупность методов и приемов получения полезных для человека продуктов и процессов с помощью

биологических агентов (наука о применении биологических процессов и систем в производстве). Строго говоря, это мало чем отличается от формулировки К. Эреки.

История развития биотехнологии разделяется на несколько периодов:

- эмпирический (*более 8 тыс. лет*);
- этиологический (*2ая половина XIX века*);
- биотехнический (*с 1933*);
- генотехнический (*с 1972*).

Использование в производстве микроорганизмов или их энзимов, обеспечивающих технологический процесс, известно издревле, однако систематизированные научные исследования были начаты лишь в XIX веке.

Особую роль биотехнологии в современном обществе обусловили и ясно обозначившиеся глобальные проблемы современности:

- рост численности народонаселения, возрастающая потребность в продуктах питания и медицинском обслуживании (по прогнозам ЮНЕСКО, к 2050 г. численность населения в мире приблизится к **10 млрд. человек**);
- истощение энергетических, водных и земельных ресурсов (так, в течение последних 20 лет потеряно более 15% плодородного почвенного слоя);
- оскудение биологического разнообразия;
- загрязнение окружающей среды;
- изменение климата.

В сравнении с технологиями химических производств биотехнология имеет следующие выигрышные стороны:

- реализация процессов происходит при невысоких температурах и давлениях;
- создается возможность получения уникальных природных продуктов;
- при использовании микроорганизмов достигается высокая скорость процессов;
- дешевизна сырья (отходы);
- бóльшая экологичность процессов;
- бóльшая простота и дешевизна технологий и аппаратуры.

Согласно прогнозам, к 2030 году с использованием биотехнологии будет производиться 35% химической продукции, 80% лекарственных средств, 50% сельскохозяйственной продукции, 2,7% ВВП развитых стран – ОЭСР (Организации экономического сотрудничества и развития – сейчас это 36 государств Европы, Азии, Америки, Австралия и Новая Зеландия).

Принято выделять следующие направления биотехнологии:

- *«красная» биотехнология* – связана с обеспечением здоровья человека и потенциальной коррекцией его генома, производством биофармацевтических препаратов;
- *«зеленая» биотехнология* – разработка и создание генетически модифицированных (ГМ) растений, устойчивых к биотическим и абиотическим стрессам (определяет современные методы ведения сельского и лесного хозяйства);

– «белая» – промышленная биотехнология - производство биотоплива, биотехнологии в пищевой, химической и нефтеперерабатывающей промышленности;

– «серая» – связана с природоохранной деятельностью, биоремедиацией;

– «синяя» биотехнология – связана с использованием морских организмов и сырьевых ресурсов.

В то же время политическое противостояние государств, история которого уходит вглубь веков, создает почву для создания бактериологического и биологического оружия – области, которую можно назвать «черной» биотехнологией.

В Японии есть музей «Отряд 731», печальная известность которого служит причиной массового паломничества сюда туристов со всего мира, но, прежде всего, самих японцев. Однако если посещение мемориала концлагеря Бухенвальд в Германии вызывает у немцев чувство содрогания, ненависти к нацизму и жалости к замученным, то японцы, особенно молодые, чаще всего выходят из музея с таким выражением лица, словно они посетили национальную святыню.

Еще бы, ведь, посещая музей, они узнают, что многие сотрудники отряда 731 после Второй мировой войны продолжали преспокойно жить и работать в их родной Стране восходящего солнца, и даже занимать ответственные посты. Включая тех, кто производил чудовищные биологические опыты на людях, которые по жестокости своей превосходили эсэсовского доктора Йозефа Менгеля.

Фабрика смерти

В 1936 году на сопках Маньчжурии заработал страшный завод. Его «сырьем» стали тысячи живых людей, а его «продукция» была способна уничтожить все человечество за считанные месяцы... Китайские крестьяне боялись даже приближаться к ужасному местечку Пинфаню близ Харбина. Что творится за высокой непроницаемой оградой, никто толком не знал. Но между собой шептались: японцы завлекают туда людей обманом или похищают, затем проводят над ними страшные опыты.

Начало этой фабрике смерти было положено еще в 1926 году, когда трон Японии занял император Хирохито. Как известно он выбрал для эпохи своего правления девиз «Сёва» («Просвещенный мир»).

Но если большинство человечества отводит науке роль служения благим целям, то Хирохито, не скрывая, прямо говорил о ее предназначении: «Наука всегда была лучшим другом убийц. Наука может убить тысячи, десятки тысяч, сотни тысяч, миллионы людей за весьма короткий промежуток времени».

Император мог судить о таких страшных вещах со знанием дела: по образованию он был биологом. Он искренне полагал, что биологическое оружие поможет Японии завоевать мир, а ему, потомуку богини Аматарасу, – исполнить свое божественное предназначение и править Вселенной.

Идеи императора о «научном оружии» воодушевляли агрессивно

настроенных японских военных. Они полностью отдавали себе отчет в том, что на одном самурайском духе и обычных вооружениях затяжную войну против западных держав, превосходящих в количественном и качественном отношении, не выиграешь. Поэтому по поручению японского генерального штаба в начале 30-х годов японский полковник и биолог Сиро Исии совершил длительный вояж по бактериологическим лабораториям Италии, Германии, СССР и Франции, в ходе которого детально выведывал все возможные подробности научных разработок. В докладе по итогам этого вояжа, представленном на рассмотрение высшего эшелона власти Японии, он утверждал, что биологическое оружие обеспечит превосходство армии Страны восходящего солнца. «В отличие от артиллерийских снарядов, бактериологическое оружие не способно мгновенно убивать живую силу, зато оно без шума поражает человеческий организм, принося медленную, но мучительную смерть, – утверждал Исии. – Производить снаряды не обязательно, можно заражать вполне мирные вещи – одежду, косметику, пищевые продукты и напитки, можно распылять бактерии с воздуха. Пусть первая атака не будет массированной – все равно бактерии будут размножаться и поражать цели»...

Неудивительно, что сей оптимистичный доклад впечатлил высшее военно-политическое руководство Японии, и оно выделило большие средства для создания полномасштабного секретного комплекса по разработке биологического оружия. На протяжении всего своего существования это подразделение имело ряд названий, но в историю вошло под наиболее известным из них – отряд 731.



Рисунок 2. - Командир отряда 731 генерал-лейтенант Сиро Исии

«Бревна» не люди, они ниже скотов»

Отряд был дислоцирован с 1932 года возле деревни Пинфань около Харбина (на тот момент территория марионеточного прояпонского государства Маньчжоу-го). Он включал почти 150 строений и блоков. В

отряд отбирались самые талантливые выпускники лучших японских университетов, цвет и надежда японской науки.

Отряд разместили в Китае, а не в Японии, по целому ряду причин. Прежде всего, при дислокации его непосредственно в метрополии, а не в колонии очень сложно было соблюсти режим полной секретности. Во-вторых, в случае утечки смертоносных материалов опасности подвергалось исключительно китайское население.

Наконец, в Китае без особого труда можно было найти и изолировать «бревна» – так высокомерные японские ученые-бактериологи окрестили тех несчастных, на ком испытывались смертельные штаммы и проводились другие бесчеловечные опыты.

«Мы считали, что «бревна» – не люди, что они даже ниже скотов. Впрочем, среди работавших в отряде ученых и исследователей не было никого, кто хоть сколько-нибудь сочувствовал «бревнам». Все считали, что истребление «бревен» – дело совершенно естественное», – заявил на Хабаровском судебном процессе один из служивших в «отряде 731».

Важнейшими экспериментами, которые ставились над подопытными, были всевозможные испытания эффективности различных штаммов самых опасных эпидемических болезней. «Коньком» Сиро Исии стала чума, эпидемии которой в средние века подчистую выкашивали население самых густонаселенных городов мира. Надо признать, что на этом пути он добился выдающихся успехов: к концу Второй мировой войны в отряде 731 был выведен штамм такой крайне опасной чумной бактерии, которая в 60 раз превосходила по вирулентности (способности заражать организм) обычную заразную палочку.

Эксперименты обставлялись, чаще всего, следующим образом. В специальных бараках устраивались особые герметичные клетки, куда запирали обреченных на смерть людей. Эти помещения были настолько малы, что подопытные не могли в них даже пошевелиться. Людям с помощью шприца вводили смертоносную вакцину, а затем целыми днями наблюдали над различными изменениями состояния организма. Потом зараженных заживо препарировали, вытаскивая органы и наблюдая, как болезнь распространяется по всем органам.

Подопытным как можно дольше не давали умереть и не зашивали вскрытые органы целыми днями, дабы эти, с позволения сказать, «доктора» могли спокойно наблюдать за болезнетворным процессом, не утруждая себя новым вскрытием. Анестезии никакой не применялось, дабы она не нарушала «естественный» ход эксперимента.

Больше всего «повезло» тем из жертв новоявленных «экспериментаторов», на ком испытывались не бактерии, а газы: эти люди умирали быстрее. «У всех подопытных, погибших от цианистого водорода, лица были багрово-красного цвета, – поведал на суде один из служащих «отряда 731». – У тех, кто умирал от иприта, все тело было обожжено так, что на труп невозможно было смотреть. Наши опыты показали, что выносливость человека приблизительно равна выносливости голубя. В

условиях, в которых погибал голубь, погибал и подопытный человек».

Когда японские военные убедились в эффективности работы спецотряда Исии, они стали разрабатывать детальные планы применения бактериологического оружия против армий и населения США и СССР. С количеством смертоносных боеприпасов проблем уже не было.

По рассказам сотрудников, к концу войны в хранилищах отряда 731 была накоплена такая критичная масса эпидемических бактерий, что если бы они при идеальных условиях были рассеяны по всему земному шару, их оказалось бы вполне достаточно, чтобы спокойно уничтожить все человечество...

В июле 1944 года лишь принципиальная позиция премьер-министра Тодзио – противника тотальной войны – спасла Соединенные Штаты от жуткой катастрофы. Японский генштаб планировал на воздушных шарах переправить на американскую территорию штаммы самых опасных вирусов – от смертельных для человека до тех, которые должны были губить скот и урожай. Но Тодзио прекрасно понимал, что Япония уже явно проигрывает войну, и на преступную атаку биологическим оружием Америка может дать адекватный ответ. Вполне вероятно, японская разведка поставила руководство страны в известность и о том, что в США полным ходом идут работы над атомным проектом. И осуществи Япония «заветную мечту» императора Хирохито, она получила бы не только Хиросиму и Нагасаки, но еще десятки других испепеленных радиоактивным атомом городов...

Но отряд 731 занимался не одним только биологическим оружием. Японские ученые по примеру эсэсовских изуверов в белых халатах также дотошно выясняли пределы выносливости человеческого организма, для чего проводили самые страшные медицинские эксперименты.

Например, доктора из спецотряда опытным путем пришли к выводу, что лучшим способом купировать обморожение является не растирание пострадавших конечностей, а погружение их в воду с температурой 122 градуса по Фаренгейту. «При температуре ниже минус 20 подопытных людей выводили ночью во двор, заставляли опускать оголенные руки или ноги в бочку с холодной водой, а потом ставили под искусственный ветер до тех пор, пока они не получали обморожение, – делился страшными воспоминаниями на суде в Хабаровске бывший сотрудник отряда. – Потом небольшой палочкой стучали по рукам, пока они не издавали звук, как при ударе о деревяшку».

Затем обмороженные конечности опускали в воду определенной температуры и, изменяя градус, с живейшим интересом наблюдали за отмиранием мышечной ткани на руках.

Среди подопытных, согласно показаниям подсудимых, оказался даже трехдневный ребенок: чтобы он не сжимал руку в кулачок и не нарушил «чистоту» эксперимента, ему загнали в средний палец иголку.

Иных жертв спецотряда заживо превращали в мумии. Для этого людей помещали в жарко натопленную комнату с самой минимальной влажностью. Человек обильно потел, все время просил пить, но ему не давали воды, пока

он полностью не высыхал. Затем тело тщательно взвешивали... В ходе этих бесчеловечных экспериментов выяснилось, что весит человеческий организм, полностью лишенный влаги, всего лишь около 22% от первоначальной массы. Именно так медики отряда 731 опытным путем подтвердили, что человеческое тело на 78% состоит из воды.

А в интересах императорских военно-воздушных сил проводились чудовищные эксперименты в барокамерах. «В вакуумную барокамеру поместили подопытного и стали постепенно откачивать воздух, – вспоминал на суде один из стажеров отряда Исии. – По мере того как разница между наружным давлением и давлением во внутренних органах увеличивалась, у него сначала вылезли глаза, потом лицо распухло до размеров большого мяча, кровеносные сосуды вздулись, как змеи, а кишечник, как живой, стал выползать наружу. Наконец, человек просто заживо взорвался».

Таким варварским способом японские врачи определяли допустимый высотный потолок для своих летчиков.

Проводились и довольно бессмысленные эксперименты на людях, так сказать, из чистого «любопытства», продиктованного, очевидно, патологическим садизмом. У подопытных наживую вырезали целые органы. Или отрезали руки и ноги и пришивали обратно, меняя местами правую и левую конечности. Или делали человеку переливание крови лошадей, обезьян, других животных. А то живого человека подвергали запредельному рентгеновскому излучению. Кого-то ошпаривали кипящей водой или же тестировали на чувствительность к электротоку. Любопытные «ученые» иногда заполняли легкие человека большим количеством дыма или газа, а, бывало, вводили в желудок живого подопытного гниющие куски разложившейся плоти...

Согласно показаниям на Хабаровском процессе сотрудников отряда 731, всего за время его существования в стенах лабораторий было уничтожено в ходе преступных человеконенавистнических экспериментов не менее трех тысяч человек.

Однако некоторые исследователи полагают, что эта цифра сильно занижена; реальных жертв палачей-экспериментаторов оказалось намного больше.

В несколько меньших масштабах, но столь же целенаправленно, выведением штаммов смертоносных болезней, предназначенных для поражения скота, птицы и урожая занимались в другом подразделении японской армии – отряде № 100, также входившем в состав Квантунской армии, и расположенном неподалеку от отряда 731.

Конец варварского конвейера

Предел существованию японской фабрики смерти положил Советский Союз. 9 августа 1945 года, в день атомной бомбардировки Нагасаки американскими ВВС, советские войска начали наступление против японской армии, и отряду было приказано эвакуироваться на Японские острова, что и началось в ночь с 10 на 11 августа.

Спеша замести срочно следы преступных экспериментов, некоторые

материалы палачи отряда 731 сжигали в специально вырытых ямах. Они уничтожили и всех оставшихся еще в живых подопытных людей. Часть несчастных «бревен» отравили газом, а иным было «благородно» позволено покончить жизнь самоубийством. В реку наспех выбросили экспонаты пресловутой «выставочной комнаты» – огромного зала, где в колбах в спирту хранились отрезанные человеческие органы, конечности, разрубленные головы. Эта «выставочная комната» могла бы послужить самым наглядным свидетельством преступной сущности отряда 731.

Но самые важные материалы, возможно, все-таки ожидая их дальнейшего использования, японские бактериологи сохранили. Их вывезли Сиро Исии и некоторые другие руководители отряда, передав все это американцам – надо думать, как своеобразный откуп за то, что в будущем их не будут преследовать и позволят вести безбедное существование...

Недаром Пентагон вскоре заявил, что «в связи с чрезвычайной важностью информации о бактериологическом оружии японской армии, правительство США решает не обвинять в военных преступлениях ни одного сотрудника отряда по подготовке бактериологической войны».

И не случайно в ответ на запрос советской стороны о выдаче и судебном преследовании членов отряда 731 Москве было заявлено Вашингтоном, что «местопребывание руководства «отряда 731», в том числе Сиро Исии, неизвестно, и обвинять отряд в военных преступлениях нет оснований».

Суд справедливый и... гуманный

Тем не менее, суд над захваченными в плен преступниками все-таки состоялся, только в Советском Союзе. С 25 по 30 декабря 1949 г. в г. Хабаровске Военный трибунал Приморского военного округа рассматривал судебные дела в отношении 12 бывших военнослужащих японской армии, которым было предъявлено обвинение в разработке и применении бактериологического оружия в годы Второй мировой войны. Процесс был открыт оглашением неизвестных ранее фактов совершения японскими военными в период с 1938 по 1945 г. преступлений, связанных с широкомасштабной подготовкой бактериологической войны, а также ее эпизодическим ведением на территории Китая. Подсудимым было предъявлено также обвинение в проведении многочисленных бесчеловечных медицинских опытов над людьми, в ходе которых «подопытные» неминуемо и крайне мучительно погибали.

Перед судом в Хабаровске предстали двенадцать бывших военнослужащих японской армии.

Состав подсудимых был весьма неоднородным: от генерала, командующего армией, до ефрейтора и санитар-лаборанта. Это объяснимо, ведь личный состав отряда № 731 почти в полном составе был эвакуирован в Японию, и советские войска пленили лишь некоторых из него, имевших непосредственное отношение к подготовке и ведению бактериологической войны.

Дело рассматривалось на открытом судебном заседании Военным

трибуналом Приморского военного округа в составе председательствующего – генерал-майора юстиции Д.Д. Черткова и членов трибунала полковника юстиции М.Л. Ильиницкого и подполковника юстиции И.Г. Воробьева. Государственное обвинение поддерживал советник юстиции 3-го класса Л.Н. Смирнов. Всем обвиняемым были предоставлены квалифицированные адвокаты.

11 подсудимых признали себя виновными полностью в предъявленном обвинении, а начальник санитарного управления Квантунской армии генерал-лейтенант Кадзицука Рюдзи признал себя виновным частично. Большинство подсудимых в последнем слове раскаивались в содеянных преступлениях, и только командующий Квантунской армией генерал Ямада Отозоо в последнем слове обратился к аргументу, который был главным у защиты и подсудимых на Нюрнбергском и Токийском военных процессах: ссылке на то, что преступления совершались исключительно по приказу вышестоящего руководства.

Подсудимые Хирузакура Дзенсаку и Кикучи Норимицу в последнем слове на процессе выразили надежду, что к суду будут привлечены главные организаторы и вдохновители бактериологической войны: японский император Хирохито, генералы Исии и Вакамацу.

Надо заметить, что советское правосудие, вопреки распространившемуся с начала горбачевской перестройки мнению о якобы беспредельной его суровости, вынесло весьма мягкие приговоры: ни одному из подсудимых Военный трибунал Приморского военного округа не вынес в качестве наказания смертную казнь через повешение, как это было предусмотрено в Указе Президиума Верховного Совета СССР о наказании военных преступников, поскольку на момент вынесения приговора смертная казнь в СССР была временно отменена. Все генералы были приговорены к двадцати пяти годам заключения в исправительно-трудовом лагере. Остальные восемь подсудимых получили от двух до двадцати лет заключения в лагерях. Все заключенные по приговору Военного трибунала, не отбывшие срок наказания полностью, были амнистированы в 1956 году и получили возможность вернуться на родину...

Смерть, поставленная на поток

Определяя производственную мощность отряда 731, обвиняемый Кавасима на допросе сообщил: «Производственный отдел мог ежемесячно изготавливать до 300 кг бактерий чумы». Таким количеством смертоносной заразы можно было истребить все население США...

Командующий Квантунской армией генерал Ямада Отозоо на допросе весьма откровенно признал: «При осмотре 731 отряда я был крайне поражен размахом исследовательской и производственной деятельности отряда по изготовлению бактериологических средств ведения войны».

Функции отряда 100 были аналогичны функциям отряда 731 с тем отличием, что в нем производились бактерии, предназначенные для заражения скота и посевов (бактерии чумы рогатого скота, овечьей оспы, мозаики, сапа, сибирской язвы).

Как было убедительно доказано на процессе, вместе с производством средств бактериологической войны параллельно велась широкомасштабная работа по поискам методов применения бактериологического оружия. В качестве распространителей смертоносных эпидемий использовались блохи, подвергавшиеся заражению. Для разведения и заражения блох применялись крысы, мыши и другие грызуны, которые отлавливались специальными командами и содержались в большом количестве в специальных загонах.

Для максимально эффективного применения бактериологического оружия Исии Сиро изобрел специальную бомбу, которая получила название «бомба системы Исии». Главная особенность этой бомбы заключалась в том, что у нее был фарфоровый корпус, куда помещались зараженные бактериями блохи. Бомба взрывалась на высоте 50-100 м над поверхностью земли, что обеспечивало максимально широкое заражение местности.

Как показал на допросе Ямада Отозоо, основными и наиболее эффективными методами применения бактериологического оружия являлись сбрасывание бактерий с самолетов и наземный способ применения бактерий.

Во время процесса было убедительно доказано, что отряды 731 и 100 японской армии вышли далеко за рамки лабораторных и полигонных испытаний бактериологического оружия и встали на путь практического применения созданного ими оружия в боевых условиях.

Известный российский специалист по международному праву И. Лукашук в одной из работ пишет: «Бактериологическое оружие было применено Японией в ходе войны против Китая. Военные трибуналы в Токио и Хабаровске квалифицировали эти действия как военные преступления». К сожалению, утверждение это верно лишь отчасти, поскольку на Токийском процессе вопрос о применении бактериологического оружия не рассматривался и о проведении экспериментов над людьми говорилось лишь в одном документе, который по вине американского обвинителя не был озвучен на процессе.

В ходе процесса в Хабаровске были приведены веские доказательства применения японскими специальными формированиями бактериологического оружия непосредственно в ходе боевых действий. В обвинительном заключении были подробно описаны три эпизода применения бактериологического оружия в войне против Китая. Летом 1940 года специальная экспедиция под командованием Исии была направлена в район боевых действий в Центральный Китай, имея большой запас блох, зараженных чумой. В районе Нинбо с самолета было произведено заражение обширной территории, в результате чего в этом районе вспыхнула сильная эпидемия чумы, о которой писали китайские газеты. Сколько тысяч людей погибли в результате этого преступления – как говорится, одному Богу известно...

Вторая экспедиция во главе с начальником одного из отделов отряда 731 подполковником Оота, применив зараженных чумой блох, распыленных с самолетов, спровоцировала эпидемию в районе города Чандэ в 1941 году.

Третья экспедиция под командованием генерала Исии была направлена

в 1942 году также в Центральный Китай, где японская армия в тот период несла поражения и отступала.

Зловещие планы японских милитаристов по широкомасштабному применению бактериологического оружия были нарушены в результате стремительного наступления Советской Армии в августе 1945 года.

Как советские солдаты спасли население Евразии, а может, и все человечество от заражения болезнетворными штаммами, красочно показано в художественном фильме 1981 года (СССР, МНР, ГДР) «Через Гоби и Хинган», снятом кинорежиссёром Василием Ордынским.

...Чтобы скрыть доказательства подготовки ведения бактериологической войны, японское командование отдало приказы о ликвидации отрядов 731 и 100 и уничтожении следов их деятельности. При этом, как огласили на суде, было совершено еще одно преступление, когда с целью ликвидации живых свидетелей с помощью цианистого калия, добавленного в пищу, умертвили большую часть заключенных тюрьмы в отряде 731. Тех, кто не принял отравленную пищу, расстреляли через смотровые окошки в камерах. Здание тюрьмы, где содержались будущие подопытные, взорвали динамитом и авиабомбами. Главное здание и лаборатории подорвали саперы...

Хабаровский судебный процесс имел своеобразное продолжение: 1 февраля 1950 года полномочные послы СССР в Вашингтоне, Лондоне и Пекине по поручению советского правительства вручили специальную ноту правительствам США, Великобритании и Китая. 3 февраля 1950 года нота была опубликована в советской печати. В этом документе приводились важнейшие факты, установленные в ходе судебного процесса Военным трибуналом Приморского военного округа.

В ноте, в частности, подчеркивалось: «Советский суд осудил 12 японских военных преступников, виновных в подготовке и применении бактериологического оружия. Было бы, однако, несправедливым оставить безнаказанными других главных организаторов и вдохновителей этих чудовищных преступлений».

В ноте к числу таких военных преступников были причислены высшие руководители Японии, в том числе Хирохито – император Японии, которому вменялось издание секретных указов по созданию на территории Маньчжурии специального центра японской армии по подготовке бактериологической войны, известного как отряд 731, и его филиалов.

В связи с изложенным в ноте правительство Союза ССР настаивало на том, чтобы назначить в ближайшее время специальный Международный военный суд и передать ему как военных преступников, изобличенных в совершении тягчайших военных преступлений.

Однако дипломатический демарш Советского правительства был обречен на печальный провал. Ведь «холодная война» уже была в полном разгаре и о былом единстве союзников перед лицом общего врага, – германского нацизма и японского милитаризма, – теперь приходилось только вспоминать...

Главных организаторов подготовки бактериологической войны Сиро Исии и заменившего его на посту руководителя отряда 731 с марта 1942 г. Китано Масадзо, которые также указывались в ноте советского правительства, американцы не пожелали привлечь к суду.

В обмен на гарантированную безопасность Исии и Китано передали ценные секретные данные, касающиеся бактериологического оружия, американским специалистам в этой области.

По утверждению японского исследователя С. Моримур, Исии американцы выделили в Токио специальное помещение, где он занялся приведением в порядок материалов отряда 731, вывезенных из Пинфаня. А советской стороне, потребовавшей выдачи организаторов и виновников совершавшихся военных преступлений, был дан проникнутый беспредельным и наглым лицемерием ответ, что «местопребывание руководства отряда 731, в том числе Исии, неизвестно и обвинять отряд в военных преступлениях нет оснований».

Предложение СССР о создании нового Международного военного суда оказалось неприемлемым для США еще и потому, что они в это время уже начали всюю освобождать японских военных преступников, осужденных американскими оккупационными военными судами в Японии. Только в конце 1949 года, – как раз когда шел в Хабаровске судебный процесс над создателями бактериологического оружия, – Комиссия по делам досрочного освобождения, созданная при штабе союзного главнокомандующего, генерала армии США Дугласа Макартура, освободила 45 таких преступников.

Своеобразным ответом на ноту СССР со стороны США было издание 7 марта 1950 года генералом Д. Макартуром циркуляра № 5, где прямо указывалось, что все японские военные преступники, отбывавшие наказание по приговорам судов, могут быть освобождены.

Это послужило причиной заявления правительством СССР очередной ноты правительству США от 11 мая 1950 года, где подобные намерения оценивались как попытка изменить или вовсе отменить решение Международного суда в Токио, что представляло собой, по мнению советской стороны, грубейшее нарушение элементарных норм и принципов международного права.

Официального ответа на предложение правительства СССР относительно создания Международного военного суда над организаторами бактериологической войны от правительств США и Великобритании так и не последовало...

Таким образом, все ученые «отряда смерти» (а это почти три тысячи человек), кроме тех, кто попал в руки СССР, избежали ответственности за свои преступные эксперименты.

Многие из тех, кто заражал болезнетворными бактериями и препарировал живых людей, стали в послевоенной Японии благообразными деканами университетов, медучилищ, маститыми академиками, оборотистыми бизнесменами.

А приснопамятный принц Такеда, инспектировавший спецотряд и восторговшийся накопленными запасами смертоносных штаммов и вирусов, не только не понес никакого наказания, а даже возглавил японский Олимпийский комитет в преддверии всемирных Игр 1964 года. Сам же злой дух Пинфаня Сиро Исии безбедно жил в Японии и умер в своей постели лишь в 1959 году. Есть свидетельства, что именно он приложил руку к сбору и хранению «правдивых» материалов о рыцарях-самураях из отряда 731, впоследствии прославивших их «подвиги» в экспозиции музея в Японии, открытого в 1978 году...

Крайне осторожно следует относиться и к появившимся возможностям создания искусственных организмов. Чего стоит только драматическая история применения в 2011 году после аварии в Мексиканском заливе нефтяной вышки «British Petroleum» созданных компанией «Synthetic Genomics Inc.» синтетических микоплазменных микоидов «JCVI-syn1.0».

Детище «Синтетик Дженомикс Инкорпорейтед» («Synthetic Genomics Inc.») создано по заказу Бритиш Петролеум якобы для борьбы с нефтяными разливами.



Рисунок 3. - Аварии в Мексиканском заливе нефтяной вышки

Это так называемые «синтетические микоплазменные микоиды JCVI-syn1.0» – микробиологи называют их просто «Синтия».

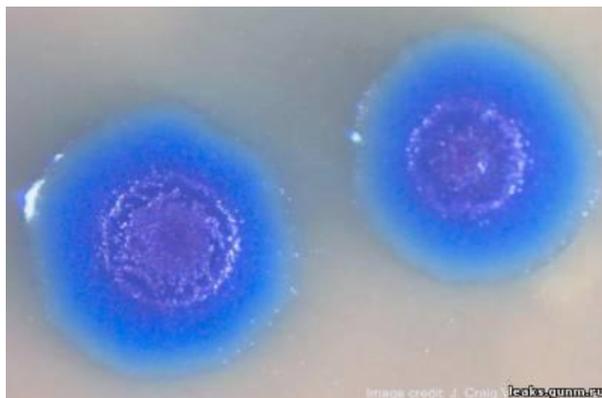


Рисунок 4. - Синтетические микоплазменные микоиды JCVI-syn1.0

Эти бактерии питаются нефтью – впрочем, и почти любой другой органикой тоже. Их клетки полностью искусственные, сконструированным компьютером геномом, вообще не содержат какой-либо природной ДНК, зато содержат в себе особые цепочки «водяных знаков» с тем, чтобы геном опознавался как искусственный. Бактерия также обладает устойчивостью к антибиотикам.

Эта новая форма жизни обладает свойством самовоспроизводиться и органически функционировать в любой клетке, в которую её внедряют.

Всё финансирование работ осуществлялось «Синтетик Дженетикс Инкорпорейтед» – компанией, с которой ВР состоит в альянсе и в которой имеет значительную долю активов.

При более внимательном рассмотрении оказалось, что речь может идти о случайном или преднамеренном создании и применении бактериологического оружия широкого спектра действия, представляющего потенциальную угрозу для жизни на Земле как таковой.

ВР уже распылило в Мексиканском заливе дисперсанты типа корексита с самолётов и морских судов – причем в состав этих дисперсантов были добавлены минеральные вещества с тем, чтобы бактерии могли более стремительно размножаться и быстрее поедать нефть. И этими бактериями-«поедателями» как раз и была «синтия».

Физические симптомы «ВР-гриппа», «ВР-слизи», «синего гриппа» – или как его ещё ни назови – столь же уникальны, как и синтетические бактерии, которые применяются в заливе. Поскольку человечество имеет в своей основе углерод, то как именно эти искусственно созданные и охочие до водорода и углерода бактерии будут воздействовать на плоть человека?

Внутренние кровотечения наряду с приводящими к изъязвлению поражениями кожи – вот типичные физические симптомы «почерка» созданной их компьютерами ДНК.

На протяжении нескольких месяцев многие взрослые и дети, искупавшиеся или погулявшие у Залива, заболевают странной болезнью, от которой нет действенных средств. В коротких новостных сообщениях то и дело констатируется смерть жителей от т.н. «неизвестного вируса», «синего гриппа» или «синей чумы». И тишина... А ведь Мексиканский залив через Атлантику соединен со всем миром...

«В моей надувной лодке была вода, и когда я перевернула её, чтобы слить воду, я слегка поцарапалась; ранка была сантиметра 2 в длину и, может, миллиметр в ширину. Это произошло в 8 утра. К 4 часам дня область вокруг ранки начала болеть и воспалилась. Участок размером с софтбоульный мячик стал цвета красного корвета и пульсировал, словно марширующий оркестр, играющий рэп. Я промыла ранку перекисью водорода и смазала её неоспорином. Думала, этого будет достаточно, чтобы с ней справиться...

Инфекция в ранке начиналась типично. Припухлость, краснота, очень интенсивная боль... усиление боли. Затем образуются "волдыри", причём очень похожие на пузыри от ожогов, только более красные, и, верите или нет, гораздо болезненнее. Ещё более жуткая особенность этих вздутий в том, что они являются первым этапом процесса, развивающегося как гангрена. Ещё страшнее (или сравнительно хуже) то, что половине пациентов требуется некрэктомия (глубокое соскабливание тканей... а можете представить выскабливание области, которая к тому же страшно болит?), но чаще – ампутация... Центр по контролю и профилактике заболеваний успокоил меня: «Радуйтесь, что у вас хоть нога осталась».

В 2014 году зараженных «Чумой Мексиканского залива» уже около 100 000 человек.

Клеточная терапия и регенерация

Класс технологий, основанный на использовании стволовых клеток, других биологических материалов (коллагеновые волокна, биоактивные вещества) в медицинских и косметологических целях. Значительный прогресс в изучении стволовых клеток, успешные опыты по выращиванию органов, создание биопринтеров, позволяющих печатать модельные среды для изучения и в перспективе органы – все это формирует широкие возможности для развития этой области биотехнологий.

Нанобиотехнологии

Позволяет, используя естественные биологические механизмы, синтезировать материалы с уникальными свойствами, например, пептоидные наноллисты – структуры толщиной в несколько нм при длине и ширине около 100 мкм. Пептоидные наноллисты используют для создания высокоэффективных гидрофобизаторов, переноса ароматических молекул. Другое использование – выращивание сенсорных элементов для нанофотоники.

На 2025 год в мире запланировано дохода от биотехнологий 2000 млрд. \$. В порядке иллюстрации биотехнологии в разных государствах можно привести несколько примеров.

Так, биотехнологический сектор США насчитывает сегодня 1 500 компаний, в том числе 386 публичных компаний с капитализацией около 360 млрд. \$. Доходы публичных биотехнологических компаний США в период с 1998 по 2007 год возросли с 20 до 65 млрд. \$, расходы на научные исследования и разработки – с 10 до 26 млрд. \$. Государственный фонд

National Institutes of Health (НИН) – крупнейший из субъектов, финансирующих биотехнологические исследования в США (с 2000 по 2008 год годовой бюджет НИН возрос с 18 до 29 млрд. \$).

Количество биотехнологических предприятий в Европейских странах составляет более 1 700, из них 180 – публичные компании, чьи доходы в 2007 году составили 13 млрд. \$. Объемы финансирования биотехнологической отрасли в Европе – 7.5 млрд. \$ в 2007 году.

Биотехнологическая отрасль Китая включает около 900 предприятий и 40 биотехнопарков в Пекине, Шанхае, Гуанчжоу. Объем продаж биотехнологической продукции, произведенной в Китае, оценивается в 10 млрд. \$. Рост инвестиций Китая в биотехнологическую отрасль: объем государственного финансирования с 2001 по 2005 год биотехнологии в Китае увеличился более с 0.1 до 1.2 млрд. \$. В 2006–2020 годы государство инвестирует 112 млрд. \$ в НИОКР, при этом биотехнология имеет высший приоритет над прочими направлениями.

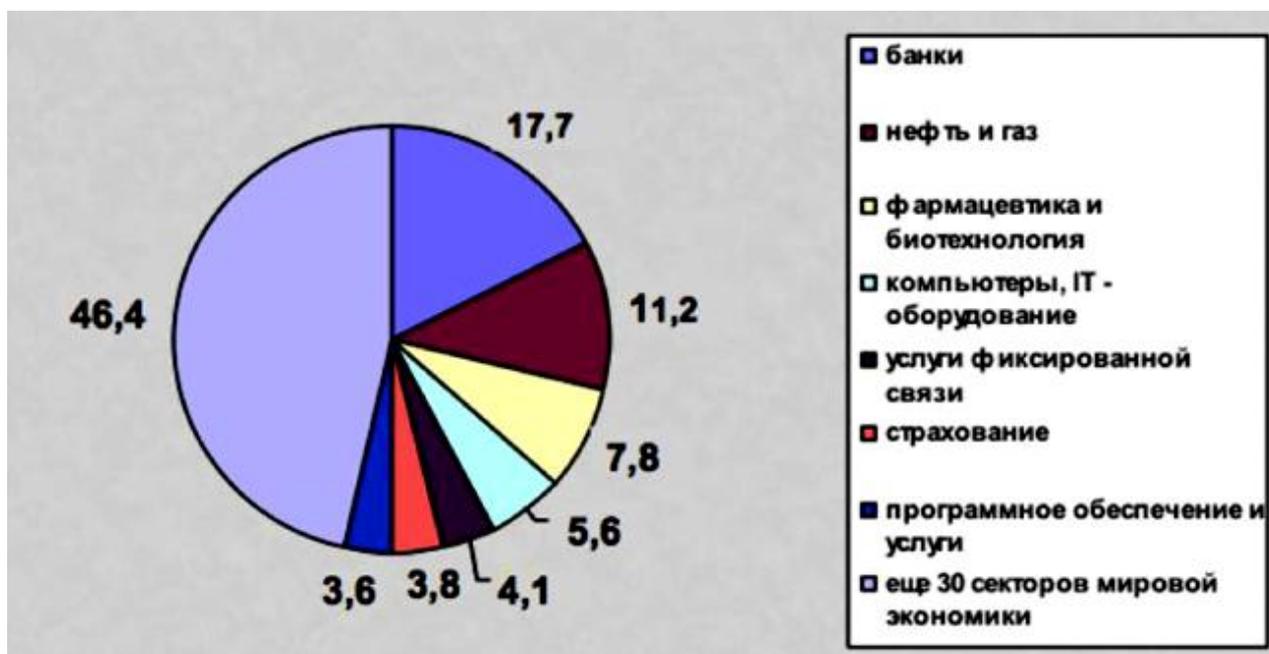


Рисунок 5. - Крупнейшие секторы мировой экономики
(по данным *Financial Times* 2/07/2011)

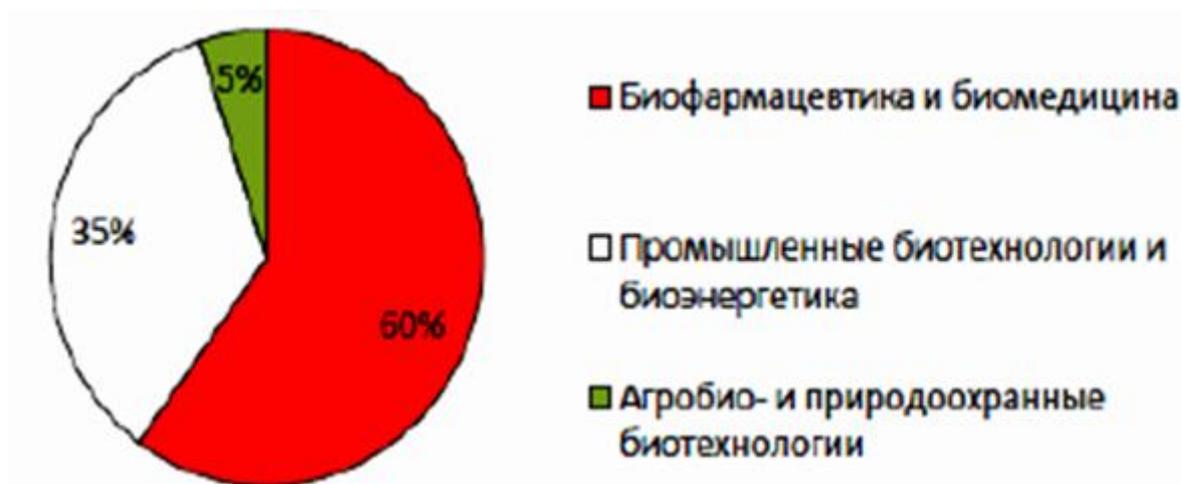


Рисунок 6. - Сегментация мирового рынка биотехнологий.
Объем рынка (2013): ~270 млрд долларов

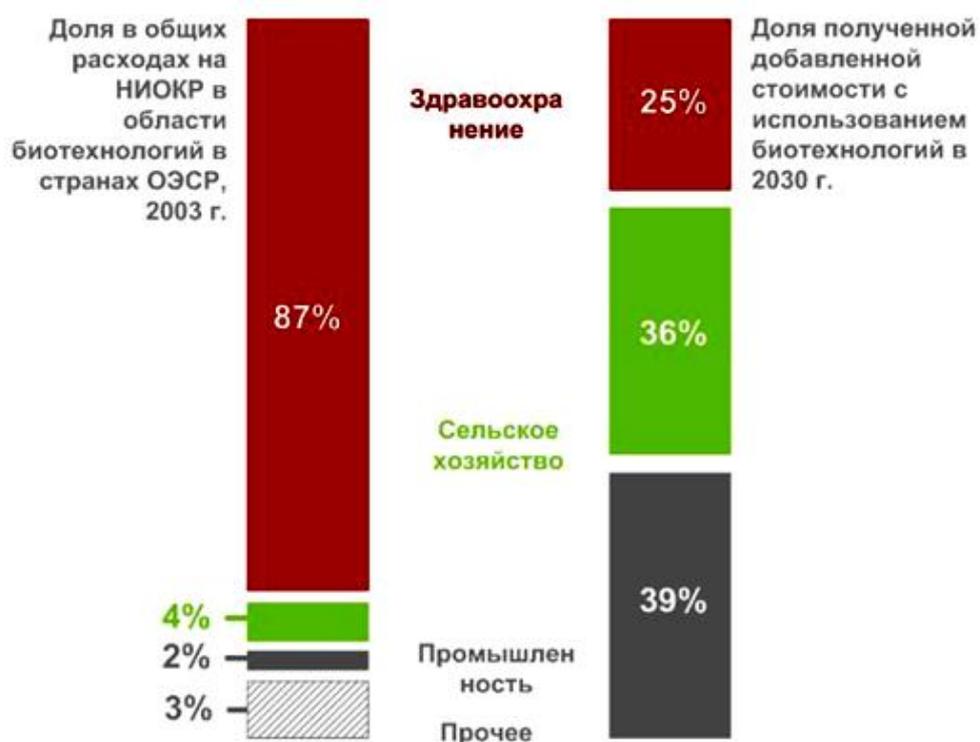


Рисунок 7. - Основные тренды развития биотехнологии в мире

Возрастание роли значения биотехнологии

К 2030 году с использованием биотехнологий будет производиться:

- 35 % химической продукции;
- 80 % лекарственных средств;
- 50 % сельскохозяйственной продукции;
- 2,7 % ВВП развитых стран.

Основные характеристики биотехнологической отрасли Индии: ежегодный темп роста в 2003-2008 гг. – 20-30%; объем продаж в 2008 году – 2,5 млрд. \$; количество биотехнологических предприятий – 330; инвестиции в сектор в 2007 году – около 600 млн. \$.

В 2014 г. на развитие **биотехнологий в Беларуси** было выделено из бюджета **10 млн. \$**. Они использованы на выполнение фундаментальных, научно-технических, государственных и межгосударственных программ в рамках ЕврАзЭС. За пять лет по государственным программам создано более 170 современных биотехнологий, модернизировано 12 действующих производств, организовано 8 центров и лабораторий, создано 9 новых предприятий и 39 биотехнологических производств. Преобладающее развитие в Беларуси получили **белая и зеленая** биотехнологии, обслуживающие промышленность и сельское хозяйство (биодизель, биогаз, в дальнейшем это может быть биоэтанол, биобутанол). В области **красной** биотехнологии, связанной с биофармацевтикой и биомедициной, также достигнуты определенные успехи.

Недавно созданная указом Президента *Белорусская национальная биотехнологическая корпорация* после выхода на полную мощность планирует экспортировать продукцию на \$ 300 млн в год.



Рисунок 8. - Белорусская национальная биотехнологическая корпорация

Строительство началось в 2018 году. Полностью его планируют завершить к 2032 году. Под площадку выделили 160 га земли, из них 120 га осваивают уже на первом этапе. Это комплекс из 12 заводов, соединенных в одну технологическую цепочку. Подписаны два межправительственных и два кредитных соглашения на 4,290 млрд юаней (около 635 млн. \$). На этой площадке будет производиться более 70 тыс. тонн аминокислот, более 500 тыс. тонн комбикормов, более 90 тыс. тонн уникальных премиксов.

Объектами современной биотехнологии являются микроорганизмы, вирусы, грибы (микро- и макромицеты), протозойные организмы, клетки и

ткани растений, а также клетки животных и человека.

При этом основой большинства современных биотехнологических производств до сих пор все еще является микробный синтез, т. е. синтез разнообразных биологически активных веществ с помощью микроорганизмов.

Биотехнология связана с рядом дисциплин, но краеугольными являются биохимия, микробиология, генетика, цитобиология животных и растений.

1. МИКРООРГАНИЗМЫ – ОСНОВНЫЕ ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Объекты биотехнологии:

- вирусы;
- бактерии;
- грибы (микро- и макромицеты);
- протозойные организмы;
- клетки и ткани растений, животных и человека.

Основой большинства современных биотехнологических производств до сих пор все еще является микробный синтез, т. е. синтез разнообразных биологически активных веществ с помощью микроорганизмов.

Микроорганизмами принято называть мельчайшие живые существа, размеры которых меньше или немногим превышают разрешающую способность человеческого глаза (0,2 мм).

Помимо применения микроскопов, изучение микроорганизмов связано с использованием особых методов их выделения из природных субстратов в виде чистых культур и выращивания на стерильных средах того или иного состава.

К настоящему времени относительно хорошо охарактеризованы (или известны) более **100 тысяч** различных видов микроорганизмов, причем открываются все новые виды. Большинство микроорганизмов в отличие от макроорганизмов одноклеточные, а имеющиеся многоклеточные формы сравнительно мало дифференцированы. Но в систематическом отношении микроорганизмы не представляют собой единой группы.

На основании особенностей организации клеток, прежде всего генетического аппарата, они **подразделяются на эукариот и прокариот**. К эукариотным микроорганизмам относятся многие водоросли, грибы и простейшие. По строению клеток они не отличаются принципиально от макроорганизмов, включая высшие растения и животных, которые также являются эукариотами.

Для всех эукариот характерно наличие в клетках ядра, окруженного мембраной и содержащего набор хромосом, в которых находится ДНК, несущая основную генетическую информацию; распределение ДНК по хромосомам связано с процессом митоза.

Кроме того, клетки эукариот имеют развитый эндоплазматический ретикулум, митохондрии (фотосинтезирующие формы и хлоропласты), а также другие органеллы общего характера. Рибосомы, находящиеся в цитоплазме, относятся к ВОС-типу. У части эукариотных микроорганизмов наряду с вегетативным и бесполом размножением установлена способность к половому процессу.

Прокариоты, или бактерии (в последнее время эти термины обычно рассматриваются как равнозначные), объединяют только микроформы.

Организация их клеток более простая, чем у эукариот. Ядро прокариот, называемое часто нуклеоидом, не окружено мембраной и представлено одной молекулой ДНК кольцевого характера. Эндоплазматический ретикулум, митохондрии и другие обособленные органеллы, свойственные эукариотам, у прокариот отсутствуют, а их функции выполняют клеточная мембрана и (или) внутриклеточные мембраны, которые обычно из нее образуются. Рибосомы относятся к 70S-типу. У эукариот такие рибосомы, а также ДНК, похожая на бактериальную, присутствуют лишь в митохондриях и хлоропластах. Это является важным аргументом в пользу филогенетического родства данных органелл с бактериями и эндосимбиотической гипотезы происхождения эукариот.

Большинство бактерий, так же как водоросли и грибы, имеют ригидную клеточную стенку. Но ее состав иной, чем у эукариот. Типичным компонентом клеточной стенки большинства прокариот, относящихся к эубактериям, является пептидгликан (муреин), состоящий из N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты. Ни у одного из эукариот такой полимер не обнаружен. Имеются различия в строении жгутиков, которые обуславливают подвижность ряда эукариот и прокариот, в составе липидов и некоторых других компонентов клеток.

Размножение бактерий чаще всего происходит путем бинарного деления, реже почкованием, образованием экзоспор или другими бесполовыми способами. У ряда бактерий установлена способность к конъюгации. Но в отличие от полового процесса у эукариот при этом происходит, как правило, лишь частичная передача ДНК из одной клетки в другую.

За последние годы установлено, что среди бактерий есть виды, существенно отличающиеся от других организмов по ряду признаков. Их предложено называть *архебактериями*, а остальных прокариот – *эубактериями*. К числу архебактерий относятся метаболитобразующие микроорганизмы, галобактерии, ряд экстремальных термоацидофилов и некоторые другие формы. Главная особенность архебактерий выражена в последовательности нуклеотидов в 16S рРНК, об этом свидетельствует анализ олигонуклеотидов, которые из них получают. В связи с консервативностью молекул рРНК этот признак считается весьма важным для определения филогенетических связей различных организмов и построения естественной системы их классификации.

Кроме того, архебактерий не содержат мурина в клеточных стенках, образуют особые липиды, в которых нет жирных кислот, а также характеризуются рядом других особенностей своего состава и метаболизма.

Некоторые исследователи считают, что архебактерий можно рассматривать как отдельное царство живых существ, возникшее в результате особой линии эволюции.

Иногда к микроорганизмам относят и вирусы. Но чаще их рассматривают как особую категорию биологических объектов, поскольку они не имеют клеточного строения, содержат в отличие от эукариот и прокариот лишь один тип нуклеиновых кислот (ДНК или РНК), и размножаются только

в клетках хозяина, каковыми могут быть разные организмы, в том числе бактерии.

Помимо вирусов, в клетках микроорганизмов могут находиться другие дополнительные элементы, несущие генетическую информацию. К числу таковых относятся плазмиды, распространенные у бактерий. Они представляют собой небольшие кольцевые молекулы ДНК, определяющие устойчивость содержащих их штаммов к лекарственным препаратам, способность воздействовать на определенные субстраты и некоторые другие признаки.

Микроорганизмам принадлежит важная роль в природных процессах, а также в практической деятельности человека. Объясняется это рядом причин.

Благодаря небольшим размерам микроорганизмы легко перемещаются с токами воздуха, по воде и другими способами. Поэтому они быстро распространяются и встречаются в самых разных местах, включая и те, где другие формы жизни иногда отсутствуют.

Важным свойством микроорганизмов является их способность к быстрому размножению. Известны бактерии, которые делятся каждые 30–60 мин и даже через 8–10 мин. В результате из одной клетки массой около $2,5 \cdot 10^{12}$ г за 2–4 сут в условиях, обеспечивающих активный рост, могла бы образоваться биомасса порядка 10^{10} т и более. В действительности этого не происходит, так как действуют разные ограничивающие факторы. Но возможности микроорганизмов к быстрому размножению намного превосходят и растения и животных.

Микроорганизмы характеризует разнообразие их физиологических и биохимических свойств. В результате некоторые из них могут расти в так называемых экстремальных условиях, которые для большинства других организмов неблагоприятны или вообще не поддерживают рост. Особенно разнообразны по свойствам бактерии.

Наряду с мезофилами, оптимальная температура для роста которых составляет 25–35 °С, среди микроорганизмов есть так называемые психрофилы, некоторые из которых при температуре выше 20 °С не растут, но могут довольно быстро развиваться при температуре, близкой к нулю. Такие микроорганизмы распространены в морях и океанах, в пещерах, но обнаруживаются и в других местах, в том числе в холодильных установках. Значительное число микроорганизмов остаются живыми при температуре –196 °С (t жидкого азота) и даже ниже. Этим часто пользуются для их длительного хранения.

С другой стороны, такие покоящиеся формы, как эндоспоры, образуемые рядом бактерий, у некоторых видов сохраняют способность к прорастанию после кипячения в течение 1–2 ч. У отдельных видов бактерий (например, *Clostridium botulinum*) споры не погибают при кратковременном повышении температуры до 160–180 °С. Известны также термофильные микроорганизмы, рост которых наблюдается при 60–80 °С и даже выше (90–110 °С). Некоторые из них при температуре ниже 60–80 °С не растут. Такие экстремальные термофилы обнаружены, например, среди бактерий,

встречающихся в геотермальных источниках.

Довольно много микроорганизмов проявляют значительную устойчивость к высокому гидростатическому давлению, а некоторые из них даже лучше растут при давлении $(1,0-3,5) \cdot 10^7$ Па. Имеются и облигатно барофильные формы. В природных условиях высокое давление бывает в глубинах морей и океанов, в придонных слоях отдельных озер (например, Байкала), а также в глубинных месторождениях нефти, где встречаются микроорганизмы.

В то же время многие микроорганизмы сохраняют жизнеспособность в условиях глубокого вакуума, особенно, если производить высушивание клеток после предварительного их замораживания. На этом основан такой широко известный способ хранения микроорганизмов, как лиофилизация.

Некоторые микроорганизмы выдерживают высокие дозы ультрафиолетовой и (или) ионизирующей радиации. К таковым относится *Micrococcus radiodurans*, обнаруженный впервые в консервированном мясе, подвергнутом воздействию γ -излучения. Констатировано также наличие радиорезистентных микроорганизмов в атомных реакторах.

Рост микроорганизмов зависит от активной кислотности (рН) среды. Для большинства видов оптимальное значение рН близко к 7,0, т. е. благоприятна нейтральная среда. Однако известны и ацидофильные формы, которые не растут при рН выше 5,0–5,5. Некоторые из них являются к тому же термофилами. К числу типичных ацидофильных микроорганизмов относится *Thiobacillus ferrooxidans*, встречающийся в кислых серных источниках и распространенный в шахтных водах месторождений разных сульфидных минералов, где в значительном количестве присутствует серная кислота и рН иногда меньше единицы. С другой стороны, есть алкалофильные микроорганизмы, оптимальное значение рН среды для роста которых 10,0–11,0. Примером могут служить некоторые бактерии рода *Bacillus*, разлагающие мочевину с образованием аммиака.

Одним из факторов, ограничивающих рост многих микроорганизмов, является высокое осмотическое давление среды. Это важно учитывать при выборе условий их культивирования. Однако есть осмофилы и даже осмофильные виды. К ним принадлежат некоторые представители дрожжей и мицелиальных грибов (например, *Xeromyces bisporus*), рост которых наблюдается на средах, содержащих 20% сахара и более. Такие микроорганизмы нередко обнаруживаются в сладких сиропах и варенье.

Известны также бактерии, называемые экстремальными галофилами, оптимальная концентрация хлористого натрия для которых 20–25%, а рост их возможен и при более высоком содержании NaCl (30–32%), т. е. практически в насыщенном его растворе. Если же концентрация хлористого натрия ниже 12%, то рост большинства таких бактерий, относящихся в основном к семейству *Halobacteriaceae*, не происходит, а у некоторых видов клетки лизируются.

Значительные различия обнаруживаются в действии на разные микроорганизмы меди, мышьяка, сурьмы, ртути и других тяжелых металлов.

Некоторые виды и штаммы проявляют к ним большую чувствительность, другие способны расти при сравнительно высоком содержании соединений этих элементов.

В зависимости от отношения микроорганизмов к молекулярному кислороду их принято делить на облигатные аэробы, факультативные анаэробы, аэротолерантные анаэробы и облигатные анаэробы. Большинство микроорганизмов, как и макроорганизмы, являются облигатными аэробами (для роста им необходим молекулярный кислород). Отдельные виды могут расти даже в атмосфере чистого кислорода. Наряду с этим есть микроорганизмы, которые хотя и нуждаются в наличии O_2 , но могут расти или лучше растут только при низком его содержании (2–10%).

Такие микроорганизмы называют микроаэрофилами, а условия, в которых они растут, микроаэробными.

Факультативные анаэробы растут как в присутствии, так и в отсутствие O_2 . Но в зависимости от условий роста происходят изменения в их метаболизме, прежде всего в энергетических процессах. Как правило, при наличии молекулярного кислорода такие микроорганизмы переключаются на окисление субстрата с участием O_2 , т. е. на аэробное дыхание, поскольку оно более выгодно, чем получение энергии в результате анаэробных процессов. Наглядным примером могут служить некоторые дрожжи, способные осуществлять в анаэробных условиях спиртовое брожение, а в аэробных полностью окисляющие в процессе дыхания сахара с образованием углекислоты и воды. Довольно много факультативных анаэробов и среди бактерий. Это *Escherichia*, некоторые представители рода *Bacillus*, *Paracoccus denitrificans* и ряд других.

К аэротолерантным анаэробам принадлежат многие молочнокислые бактерии, способные расти в присутствии молекулярного кислорода, но при этом их метаболизм остается таким же, как и в анаэробных условиях. И в том и в другом случае они осуществляют брожение.

Облигатные анаэробы не только не нуждаются для роста в наличии молекулярного кислорода, но для многих видов он токсичен даже в ничтожно малой концентрации. Поэтому выделение и культивирование таких микроорганизмов часто сложно. К числу строгих анаэробов относятся метанообразующие, сульфатредуцирующие бактерии и ряд других прокариот. Среди эукариотных микроорганизмов облигатными анаэробами являются некоторые простейшие, в частности отдельные представители трихомонад. Обнаружены такие формы и среди грибов, но, видимо, это свойство имеет у эукариот вторичное происхождение возникло в результате утраты способности использовать молекулярный кислород в своем метаболизме. Напротив, облигатные анаэробы из числа бактерий рассматриваются как наиболее древние формы жизни.

Разнообразны возможные типы питания микроорганизмов. Часть из них, называемые **фототрофами**, как и зеленые растения, способны использовать для роста энергию света (пурпурные и зеленые бактерии, цианобактерии, прохлорофиты, некоторые галобактерии и водоросли).

Остальные микроорганизмы, носящие название **хемотрофов**, так же как животные и человек, получают энергию в результате окисления различных химических веществ. Среди фото- и хемотрофов известны виды, способные все соединения клеток синтезировать из углекислоты. Их называют **автотрофами**. Особенно много автотрофов среди организмов, использующих в качестве источника энергии свет (возможность фотосинтеза).

Многим микроорганизмам, как и животным, необходимы для роста органические соединения, которые используются ими в биосинтетических целях. Они носят название **гетеротрофов**.

В случае хемотрофов окисляемый субстрат, иначе называемый донором электронов, обеспечивает получение организмом энергии и биосинтетические реакции восстановительного характера. У фототрофов донор электронов выполняет обычно только вторую функцию, поскольку источником энергии служит свет.

Таким образом, с учетом источника энергии, донора электронов и характера веществ, используемых в биосинтетических процессах, возможных типов питания восемь; каждый из них реализуется большим или меньшим числом микроорганизмов, относящихся к прокариотам. В отличие от этого эукариотные микроорганизмы, как и макроорганизмы, проявляют способность либо к фотолитоавтотрофии, либо к хемоорганогетеротрофии. Первый тип питания присущ водорослям и высшим растениям, второй – грибам, животным, включая простейшие, и человеку. Другие типы питания, очевидно, оказались менее удачными и не явились основой для двух основных направлений эволюции, приведших к возникновению высокоорганизованных форм эукариот.

В то же время сохранение у бактерий разных типов питания, видимо, имеет существенное значение для их выживания при наличии более совершенных форм и позволяет нередко расти в весьма специфических условиях.

Кроме того, *микроорганизмы в целом характеризуются способностью использовать гораздо больше химических веществ, чем макроорганизмы. Это касается прежде всего соединений углерода.*

Некоторые микроорганизмы растут на очень сложных органических средах, содержащих те или иные факторы роста, т.е. вещества, которые необходимы им в готовом виде, поскольку синтезировать их они сами не могут. Чаще всего факторами роста являются витамины, но могут быть аминокислоты, пурины, пиримидины и другие органические соединения. Даже отдельные виды и штаммы микроорганизмов, которых относят к автотрофам, обнаруживают такую потребность.

Организмы, нуждающиеся в факторах роста, называют **ауксотрофами** с указанием на то, в каком или в каких конкретно готовых соединениях они нуждаются. Соответственно виды и штаммы, не обнаруживающие эту потребность, носят название **прототрофов**. К числу микроорганизмов, проявляющих высокую требовательность к составу среды и нуждающихся и

ряде факторов роста, относятся многие молочнокислые бактерии, а также представители простейших. Аукеотрофны штаммы микро-организмов легко образуются в результате мутаций.

Известны также микроорганизмы (называемые **паратрофами**), которые являются облигатными внутриклеточными паразитами. К числу таковых относятся риккетсии.

Из-за высокой требовательности в отношении питания подбор сред для выращивания некоторых микроорганизмов является сложной проблемой, а часть видов на искусственных средах культивировать вообще пока не удается. Но многие микроорганизмы, даже из числа гетеротрофов, хорошо растут на едких средах, содержащих всего одно органическое соединение углерода, которое используется как источник энергии и в биосинтетических целях.

Значительное число микроорганизмов способно использовать белки, нуклеиновые кислоты, парафины, разные углеводы, целлюлозу и другие высокомолекулярные вещества,

С другой стороны, есть микроорганизмы, рост которых обеспечивают такие простые органические вещества, как этанол, ацетат, гликолат и многие другие. Широко распространены так называемые метилотрофы, использующие в качестве источника энергии и углерода метан, метанол, метилированные амины и монооксид углерода, которые рост макроорганизмов не поддерживают, а многие даже токсичны.

Наряду с использованием различных природных соединений углерода некоторые микроорганизмы могут воздействовать и на синтетические вещества, включая пластмассы и пестициды.

Характерная особенность ряда бактерий – способность расти, получая энергию в результате окисления молекулярного водорода, сероводорода, аммония, нитритов, солей двухвалентного железа и некоторых других неорганических соединений. При этом многие из них растут в автотрофных условиях. Соответственно окисляемым субстратам выделяют такие группы хемолитоавтотрофов, как водородные, нитрифицирующие, серные бактерии, железобактерии. К числу хемолитоавтотрофных микроорганизмов, окисляющих H_2 , относятся также многие метанобразующие бактерии, отдельные представители ацетатобразующих, сульфат- и серовосстанавливающих бактерий.

Различные возможности проявляют микроорганизмы в отношении источников азота. Некоторые виды хорошо растут на средах с пептоном и другими органическими азотсодержащими соединениями, в том числе мочевиной. Значительное число микроорганизмов могут ассимилировать нитраты и еще больше аммоний.

Интересной и важной особенностью ряда прокариотных микроорганизмов является их способность фиксировать молекулярный азот. Долгое время считалось, что это свойство проявляется лишь у немногих видов, как-то у азотобактеров, отдельных представителей клостридий и фототрофных бактерий, а также у клубеньковых бактерий. Однако в

последние годы показано, что способность к ассимиляции молекулярного азота распространена более широко.

Многие микроорганизмы, как и растения, могут использовать для синтеза серусодержащих соединений клеток сульфаты. Но некоторые виды способностью к ассимиляционной сульфатредукции не обладают и поэтому нуждаются для роста в наличии восстановленных соединений серы.

Помимо потребности в так называемых макроэлементах, или основных биоэлементах, к которым относят углерод, азот, кислород, водород, фосфор, серу, магний, железо, калий и кальций, микроорганизмы нуждаются для роста в ряде других элементов, но обычно в гораздо меньшем количестве. Поэтому их называют микроэлементами или минорными биоэлементами. В основном это различные металлы (цинк, медь, кобальт, никель, молибден, медь и ряд других), входящие в состав отдельных ферментов. Однако следует отметить, что потребность отдельных микроорганизмов в некоторых элементах может существенно различаться и зависит иногда от условий их роста.

Например, потребность бактерий в молибдене существенно возрастает при использовании ими в качестве источника азота нитратов или молекулярного азота, поскольку этот элемент входит в состав нитратредуктазы и нитрогеназы, т. е. ферментов, участвующих в ассимиляции клетками соответственно NO_3^- и N_2 . Для роста бактерий, получающих энергию в результате окисления Fe^{2+} до Fe^{3+} , железо необходимо в значительно большем количестве, чем требуется другим организмам.

Для многих известных микроорганизмов характерен лабильный метаболизм. Такая способность выражается не только в их способности использовать большое число разных соединений углерода, азота и других элементов, но нередко проявляется в переключении с одного типа питания на другой. Например, значительное число фототрофных микроорганизмов могут расти в темноте в гетеротрофных, а некоторые и в автотрофных условиях. Ряд бактерий проявляет способность и к хемолитоавтотрофии, и к хемоорганогетеротрофии. Такие организмы принято называть факультативными автотрофами.

Некоторые микроорганизмы обнаруживают способность к так называемой миксотрофии, или смешанному типу питания. Например, одновременное использование в процессах биосинтеза органических веществ и ассимиляции углекислоты по тому же типу, как в автотрофных условиях. Известны также случаи, когда микроорганизмы одновременно окисляют и органические и неорганические субстраты. Особенно четко способность к миксотрофии проявляется при их культивировании в проточных условиях с лимитированием по разным субстратам.

Однако ряд микроорганизмов характеризуется постоянством своих потребностей в питании и, соответственно, процессах метаболизма. Среди них есть облигатные фототрофы и облигатные хемотрофы. Известны облигатные автотрофы, которые используют органические вещества, в очень

ограниченной степени и во всех условиях основным источником углерода для них служит углекислота. Примером могут служить многие цианобактерии и нитрифицирующие бактерии. Напротив, некоторым гетеротрофам всегда необходимы определенные органические соединения. Часть из них, как уже отмечалось, удастся культивировать только на сложных средах, содержащих ряд факторов роста. К числу таковых относится, например, ряд молочнокислых бактерий. Но есть микроорганизмы, рост которых возможен на средах, содержащих очень простые органические вещества, например метан или метанол. Однако другие соединения углерода их заменить не могут.

Изучение различных микроорганизмов значительно расширило представление о том, в каких условиях возможно существование жизни. В результате проведенных исследований установлен также ряд важнейших биохимических закономерностей. Оказалось, что многие реакции, которые имеют место у микроорганизмов, аналогичны таковым у растений и животных. Это подтверждает биохимическое единство всех организмов, обитающих на Земле. Вместе с тем установлено, что некоторые микроорганизмы имеют особенности не только в составе своих клеток, но и в тех процессах, которые могут осуществлять.

Выше уже отмечалось, что только некоторые бактерии способны ассимилировать молекулярный азот с образованием из него аммиака, который используется для синтеза аминокислот и других азотсодержащих веществ клеток. Лишь некоторые микроорганизмы могут расти, используя углеводороды, лигнин и ряд других соединений углерода, а также получая энергию в результате окисления ряда неорганических веществ. Это определяется наличием у них особых ферментов, катализирующих реакции, к которым микроорганизмы не способны. Только среди микроорганизмов есть виды, способные расти в отсутствие молекулярного кислорода в результате таких энергетических процессов, как различные брожения и анаэробное дыхание.

До недавнего времени считали, что фотосинтез облигатно связан с наличием у организмов, которые его осуществляют, того или иного хлорофилла, представляющего собой магнийсодержащие тетрапиррольные пигменты. Однако недавно установлено, что у галобактерий, способных к фотосинтезу, данный процесс происходит при участии пигментбелкового комплекса бактериородопсина, в который входит каротиноид ретиналь.

Большинство автотрофов, включая растения и микроорганизмы, ассимилируют углекислоту в результате действия рибулезобисфосфатного цикла, называемого также циклом Кальвина. Однако у фототрофных зеленых серобактерий, а также у некоторых хемотрофных бактерий (*Hydrogenobacter* и *Sulfolobus*), как недавно установлено, функционирует совершенно иная система автотрофной ассимиляции углекислоты, получившая название восстановительного цикла трикарбоновых кислот.

Похожим путем ассимилируют углекислоту метанобразующие бактерии, но процесс не имеет циклического характера. Аналогичным

образом, видимо, происходит усвоение углекислоты анаэробными бактериями, образующими ацетат, а также некоторыми другими анаэробами из числа прокариот.

Важным результатом изучения метаболизма микроорганизмов, способных расти за счет использования метана, метанола и других C1-соединений, более восстановленных, чем CO₂, является открытие у них трех принципиально различных путей ассимиляции формальдегида: серинового, рибулезомонофосфатного и ксилулезофосфатного циклов. Таких примеров, свидетельствующих о разнообразии путей ассимиляции и диссимиляции микроорганизмов различных соединений, можно привести очень много.

Огромное значение имело и продолжает иметь изучение микроорганизмов для развития молекулярной биологии и генетики. Достаточно напомнить, что первые данные относительно роли дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) как носителя генетической информации были получены в опытах на бактериях. Достижения в области молекулярной биологии и генетики микроорганизмов явились основой развития генетической инженерии. Изучение микроорганизмов вносит также много нового в понимание биологической эволюции и представляет большой интерес в связи с вопросом о существовании жизни на других планетах.

Трудно переоценить значение микроорганизмов в круговороте веществ, который осуществляется в природе. В результате способности воздействовать на разнообразные субстраты, нередко накапливая при этом в среде те или иные продукты метаболизма, и быстро расти в разных условиях микроорганизмы вызывают существенные изменения в окружающей среде. Они играют важнейшую роль в превращении многих веществ в почве и водоемах, участвуют в формировании и разрушении месторождений ряда полезных ископаемых, а также других природных процессах.

Без многих процессов, которые осуществляют микроорганизмы в природе, жизнь на Земле давно бы прекратилась или приняла другие формы. Наглядным примером значения микроорганизмов в природе является их активное участие в разложении азотсодержащих органических веществ в почве, ведущем к образованию аммония и нитратов, а также фиксация молекулярного азота, от чего зависит рост растений.

Не меньшее значение имеет разложение микроорганизмами и безазотистых полимерных соединений, прежде всего целлюлозы, которая в огромных количествах образуется ежегодно растениями. В результате деятельности микроорганизмов происходит также освобождение окружающей среды от ряда загрязняющих и ядовитых веществ, в частности пестицидов.

Однако не все микроорганизмы и не всегда полезны. Некоторые из них, как известно, являются возбудителями разных заболеваний человека, животных и растений. Не все микробиологические процессы, происходящие в почвах, повышают их плодородие, некоторые из них имеют обратное действие. При массовом развитии водорослей и ряда других микроорганизмов в водоемах могут происходить нежелательные изменения

их режимов, а также накопление веществ, токсичных для человека и животных.

В результате роста микроорганизмов нередко происходит порча сельскохозяйственной продукции, промышленных изделий и сооружений, в частности подземных трубопроводов и металлического оборудования в шахтах. Поэтому необходима работа по предупреждению таких явлений, наносящих существенный ущерб народному хозяйству.

С другой стороны, микроорганизмы давно используются человеком для получения некоторых продуктов питания и для других целей. Особенно интенсивно микробиологическая промышленность развивается в последние годы. Основой для этого служит изучение свойств разных микроорганизмов, прежде всего их физиологии, биохимии и генетики. В результате этого установлено, что с помощью микроорганизмов можно получать самые разные вещества, в том числе те, которые химическим путем синтезировать еще не удается или такой путь более сложный и дорогой.

Из разных микроорганизмов наиболее широкое применение имеют дрожжи, относящиеся к одноклеточным грибам. Отдельные производства основаны на использовании мицелиальных грибов. Ряд промышленных процессов связан с применением бактерий, принадлежащих к разным систематическим группам. Среди них есть и анаэробы и аэробы, в меньшей степени используются пока водоросли и еще реже простейшие. Можно полагать, что в ближайшее время будут найдены новые микроорганизмы, представляющие практический интерес. Примером могут служить недавно обнаруженные термофильные анаэробы, образующие в значительном количестве уксусную кислоту и другие продукты, имеющие практическое значение. Использование их в производстве дает ряд преимуществ по сравнению с теми видами, которые нашли применение раньше.

Важное значение для микробиологической промышленности имеет получение мутантов, способных к образованию требуемых продуктов в большем количестве, чем исходные штаммы. Некоторые из таких мутантов, например, синтезирующих пенициллин, с успехом используют в заводских условиях.

В последнее время для получения штаммов микроорганизмов с полезными свойствами начали применять генную инженерию. Таким путем удалось, например, перенести гены, обуславливающие способность к азотфиксации, в бактерии, которые таким свойством не обладали. В результате введения в клетки *Methylophilus methylotrophus* гена, ответственного за синтез глутаматдегидрогеназы, повышена скорость роста этой бактерии, используемой в крупнотоннажном производстве белка на основе переработки метанола.

Большим успехом является клонирование в клетках микроорганизмов генов, определяющих способность к синтезу проинсулина, интерферона и гормона роста человека. В результате появилась возможность с помощью соответствующих штаммов микроорганизмов получать эти ценные для медицины соединения.

Очень важным для использования микроорганизмов в промышленности является подбор сред и условий культивирования на основе глубокого знания процессов метаболизма, что позволяет регулировать их биохимическую активность.

Многие микробиологические производства основаны на использовании растущих культур соответствующих видов. Из разных способов выращивания микроорганизмов наибольшие возможности дает непрерывно-проточное культивирование, применение которого в производственных условиях все расширяется.

Для получения некоторых продуктов используют суспензии клеток, а также клетки микроорганизмов в иммобилизованном состоянии, связанные с тем или иным носителем. В таком виде они могут длительное время сохранять свою ферментативную активность и многократно применяться для синтеза ряда веществ, в частности некоторых аминокислот.

Продолжаются также работы по совершенствованию приборов и аппаратов, используемых в микробиологических производствах. Таким образом, в настоящее время промышленная микробиология представляет собой важную область биотехнологии, базирующуюся на достижениях микробиологии, биохимии, молекулярной биологии, генетики, математики и техники.

Многочисленные микроорганизмы (бактерии, грибы, простейшие, вирусы) строго систематизированы в определенном порядке по их сходству, различиям и взаимоотношениям между собой. Этим занимается специальная наука, называемая систематикой микроорганизмов. Раздел систематики, изучающий принципы классификации, называется таксономией. **Таксон** – группа организмов, объединенная по определенным однородным свойствам в рамках той или иной таксономической категории. Самой крупной таксономической категорией является **царство**, более мелкими – подцарство, отдел, класс, порядок, семейство, род, вид, подвид и др. В основу таксономии микроорганизмов положены их морфологические, физиологические, биохимические, молекулярно-биологические свойства.

Весь мир микробов подразделяется на три царства:

- **царство эукариотов (грибы и простейшие);**
- **царство прокариотов (бактерии, риккетсии, микоплазмы);**
- **царство вирусов.**

Эукариоты подобны клеткам растений и животных. Они имеют поверхностную мембрану и внутриклеточную систему элементарных мембран, составляющих эндоплазматическую ретикулярную сеть и комплекс Гольджи. В цитоплазме эукариотов содержится оформленное ядро, митохондрии, рибосомы и ряд других органелл. Размножаются простые эукариоты половым и бесполом путями.

Прокариоты – организмы, не имеющие отграниченного ядра, внутриклеточной системы элементарных мембран и митохондрий, а некоторые лишены также клеточной стенки. Размножаются простым по-

перечным делением или почкованием.

Вирусы – имеют неклеточную структуру, являющиеся абсолютными паразитами, репродукция которых внутри клеток происходит с помощью энергообменных систем клетки-хозяина.

Одной из основных таксономических категорий является вид (*species*) – совокупность особей, имеющих общий корень происхождения, сходный генотип и максимально близкие фенотипические признаки и свойства.

Совокупность однородных микроорганизмов, выделенных на питательной среде, характеризующаяся сходными морфологическими, тинкториальными (отношение к красителям), культуральными, биохимическими и антигенными свойствами, называется чистой культурой. Чистая культура микроорганизмов, выделенных из определенного источника и отличающихся от других представителей вида, называется штаммом.

Штамм – более узкое понятие, чем вид или подвид. Близким к штамму является понятие клона. **Клон** – это совокупность потомков, выращенных из одной микробной клетки.

Решением Международного конгресса для микроорганизмов рекомендованы следующие таксономические категории: царство, отдел, класс, порядок, семейство, род, вид.

Название вида соответствует бинарной номенклатуре, т. е. Состоит из двух слов. Например, кишечная палочка пишется как *Escherichia coli*. Первое слово – название рода, которое начинается с прописной буквы, второе слово обозначает вид и пишется со строчной буквы. При повторном написании вида родовое название сокращается до начальной буквы, например *E. coli*.

Модельные объекты (при исследованиях фундаментальных жизненных процессов) – кишечная палочка (*E. coli*), сенная палочка (*Bac. subtilis*) и пекарские дрожжи (*S. cerevisiae*).

Базовые объекты биотехнологии. Во многих биотехнологических процессах используют ограниченное число микроорганизмов, которые классифицируются как GRAS («generally recognized as safe» обычно считаются безопасными): бактерии *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, другие виды бацилл и лактобацилл, виды *Streptomyces*, виды грибов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* и дрожжей *Saccharomyces* и др. GRAS-микроорганизмы непатогенные, нетоксичные и, в основном, не образуют антибиотики.

Формы бактерий

Всем бактериям присущи определенные морфологические свойства (форма, размер, характер их расположения в мазке) и тинкториальные свойства (способность окрашиваться).

Различают 4 основные формы бактерий (рис. 9.): шаровидные (сферические), или кокковидные (от греч. *kokkos* – зерно); палочковидные (цилиндрические); извитые (спиралевидные); нитевидные. Кроме того, существуют бактерии, имеющие треугольную, звездообразную, тарелкообразную форму. Обнаружены так называемые квадратные бактерии, которые образуют скопления из 8-ми или 16-ти клеток в виде пласта.

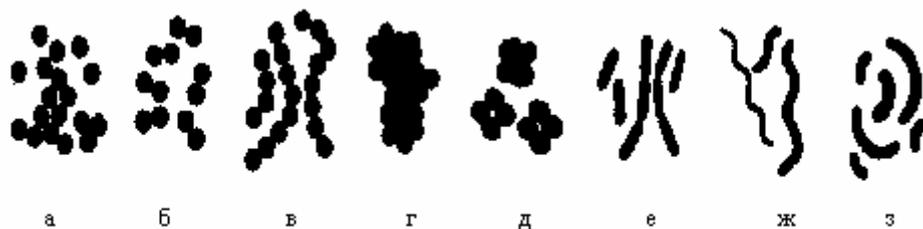


Рисунок 9. - Формы одноклеточных бактерий:

а – микрококки; б – диплококки; в – стрептококки; г – стафилококки;
д – сарцины; е – палочковидные бактерии; ж – спириллы; з – вибрионы

Кокковидные бактерии обычно имеют форму правильного шара диаметром 1,0–1,5 мкм; некоторые – бобовидную, ланцетовидную, эллипсовидную форму. По характеру взаиморасположения образующихся после деления клеток кокки подразделяют на следующие группы:

Микрококки (от лат. *micros* – малый). Клетки делятся в одной плоскости и чаще всего сразу же отделяются от материнской. Располагаются поодиночке, беспорядочно (рис. 1.а).

Диплококки (от лат. *diplos* – двойной). Деление происходит в одной плоскости с образованием пар клеток, имеющих либо бобовидную, либо ланцетовидную форму (рис. 1.б).

Стрептококки (от лат. *streptos* – цепочка). Деление клеток происходит в одной плоскости, но размножающиеся клетки сохраняют между собой связь и образуют различной длины цепочки, напоминающие нити бус. Многие стрептококки являются вредными для человека и вызывают различные заболевания: скарлатину, ангину, гнойные воспаления и др. Например *Streptococcus pyogenes* (рис. 1.в).

Стафилококки (от лат. *staphyle* – гроздь винограда). Клетки делятся в нескольких плоскостях, а образующиеся клетки располагаются скоплениями, напоминающими гроздь винограда (рис. 1.г).

Тетракокки (от лат. *tetra* – четыре). Деление происходит в двух взаимно перпендикулярных плоскостях с образованием тетрад.

Сарцины (от лат. *sarcina* – связка, тюк). Деление происходит в трех взаимно перпендикулярных плоскостях с образованием пакетов (тюков) из 8-ми, 16-ти, 32-х и большего числа особей. Особенно часто встречаются в воздухе (рис. 1.д).

Палочковидные (цилиндрические формы) (рис. 1.е).

По расположению палочки подразделяют:

– на одиночные или беспорядочно расположенные – монобактерии.

Например, *Escherihia coli*;

– располагающиеся попарно (по одной линии) – диплобациллы, диплобактерии. Например, *Pseudomonas*;

– располагающиеся цепочкой – стрептобациллы, стрептобактерии.

Например, *Bacillus*.

Палочки, образующие споры, подразделяют:

– на бациллы – аэробные спорообразующие бактерии. Споры у таких

палочек располагается, как правило, центрально, и её диаметр не превышает ширины бактерии.

– клостридии – анаэробные спорообразующие бактерии. Спора у них располагается терминально или субтерминально. Она крупная, что растягивает оболочку бактерий, и они внешне напоминают веретено или теннисную ракетку.

Извитые (спиралевидные) формы

По количеству и характеру завитков, а также по диаметру клеток они подразделяются на три группы:

Вибрионы (от греч. *vibrō* – извиваюсь, изгибаюсь) имеют один изгиб, не превышающий четверти оборота спирали. Например, *Vibrio* (рис. 1.3).

Спириллы (от греч. *speira* – завиток) – клетки, имеющие большой диаметр и малое (2–3) количество завитков. Например – *Spirillum minor* (рис. 1.ж).

Спирохеты (от греч. *speira* – завиток, *chaita* – волос) – спиралевидной формы подвижные бактерии.

Нитевидные формы

Различают два типа нитевидных бактерий: образующие временные нити и постоянные.

Временные нити (иногда с ветвлениями) образуют палочковидные бактерии при нарушении условий их роста или регуляции клеточного деления (микобактерии, коринебактерии, а также риккетсии, микоплазмы, многие грамотрицательные и грамположительные бактерии). При восстановлении механизма регуляции деления и нормальных условий роста эти бактерии восстанавливают обычные для них размеры.

Постоянные нитевидные формы образуются из палочковидных клеток, соединяющихся в длинные цепочки либо с помощью слизи, либо чехлами, либо мостиками (серобактерии, железобактерии).

Для изучения **тинкториальных свойств** микроорганизмов и их морфологии используют анилиновые красители (основные, кислые и нейтральные).

Наибольшее применение имеют основные краски: метиленовый синий, основной фуксин, генцианвиолет, везувин, хризоидин и др. Реже применяются нейтральные (нейтральный красный) и кислые (эозин) краски. Из названных красок готовят спиртовые, водно-спиртовые и водные растворы. В некоторых случаях для повышения красящей силы раствора к нему добавляют протравы, например карболовую кислоту, щелочь и др.

Для определения формы бактерий и их взаимного расположения в мазке используют простые методы окраски, т. е. окраска осуществляется одним красителем и мазок получается окрашенным одним цветом. Например, метиленовый синий. Эта окраска позволяет лучше выявить бобовидную форму и парное расположение кокков. Для изучения структуры бактериальной клетки и выявления особенностей её строения применяют сложные методы окраски, которые включают в себя целый ряд красящих веществ, протравы и дифференцирующие вещества. К сложным методам

окраски относятся методы Грама, Нессера, Ожешко и др.

Структура бактериальной клетки и методы ее исследования

Бактерии являются прокариотами (рис. 10) и существенно отличаются от клеток растений и животных (эукариотов). Они относятся к одноклеточным организмам и состоят из клеточной стенки, цитоплазматической мембраны, цитоплазмы, нуклеоида (обязательных компонентов бактериальной клетки). Некоторые бактерии могут иметь жгутики, капсулы, споры (необязательные компоненты бактериальной клетки).

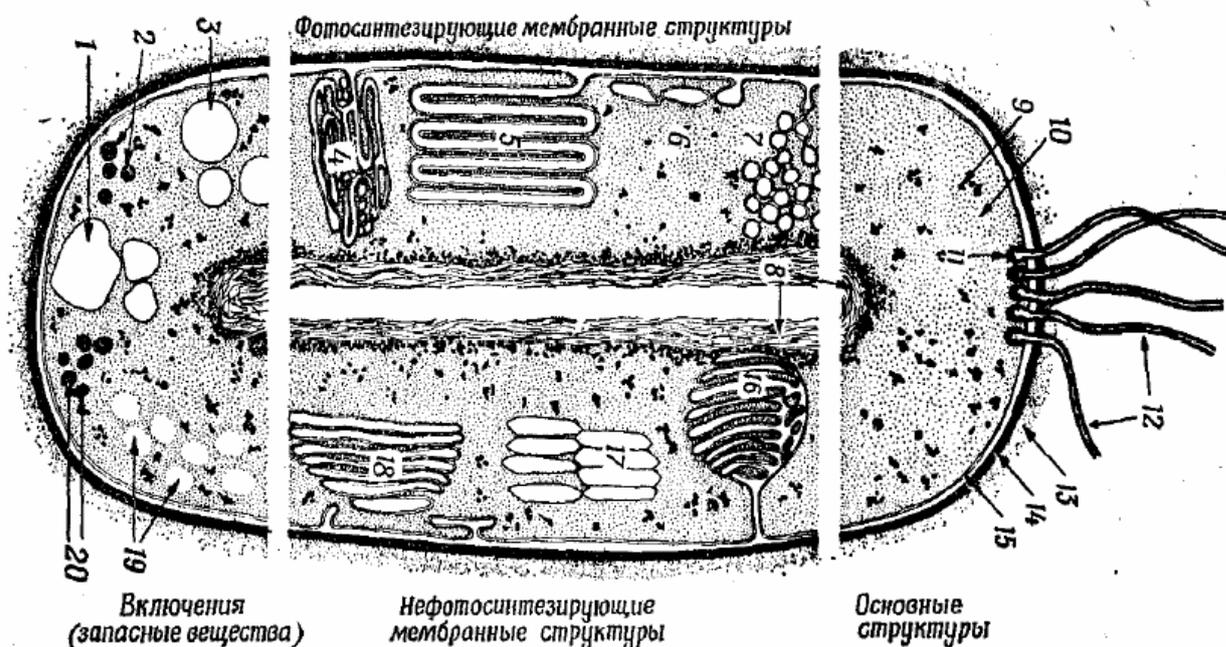


Рисунок 10. - Комбинированное схематическое изображение прокариотической (бактериальной) клетки со жгутиками.

1 – гранулы полиоксимасляной кислоты; 2 – жировые капельки; 3 – включения серы; 4 – трубчатые тилакоиды; 5 – пластинчатые тилакоиды; 6 – пузырьки; 7 – хроматофоры; 8 – ядро (нуклеоид); 9 – рибосомы; 10 – цитоплазма; 11 – базальное тельце; 12 – жгутики; 13 – капсула; 14 – клеточная стенка; 15 – цитоплазматическая мембрана; 16 – мезосома; 17 – газовые вакуоли; 18 – ламеллярные структуры; 19 – гранулы полисахарида; 20 – гранулы полифосфата

Клеточная стенка

Клеточная стенка представляет собой внешнюю структуру бактерий толщиной 30–35 нм, главным компонентом которой является пептидогликан (муреин). Пептидогликан является структурным полимером, состоящим из чередующихся субъединиц N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, соединенных гликозидными связями (рис.11).



Рисунок 11. - Схематическое изображение однослойной структуры пептидогликана

Параллельно расположенные полисахаридные (гликановые) цепи скреплены между собой поперечными пептидными мостиками (рис. 12).

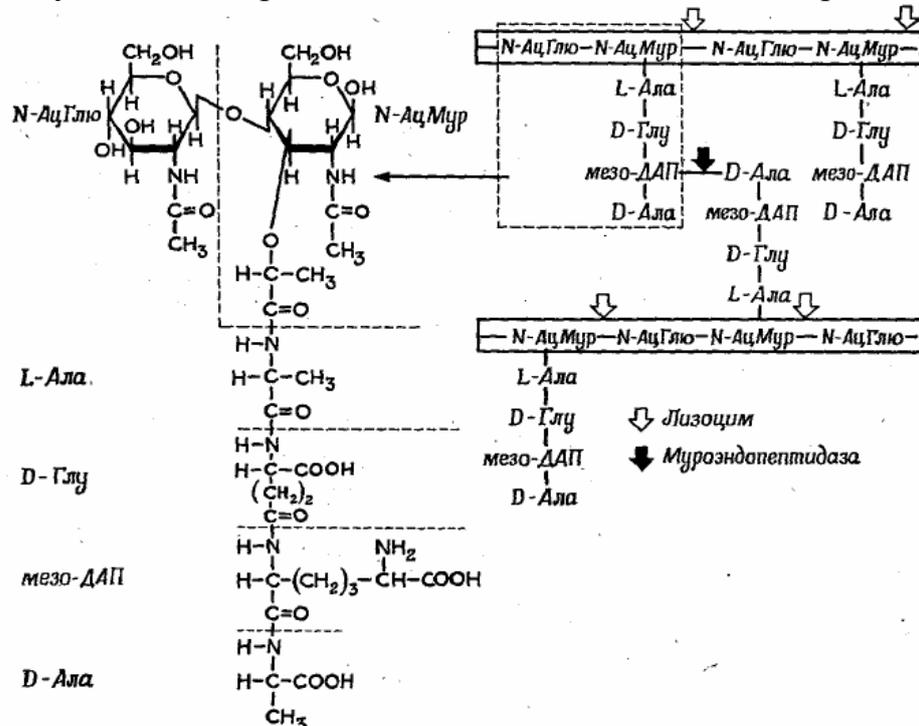


Рисунок 12. - Детальное строение структуры пептидогликана

Светлые и черные короткие стрелки указывают связи, расщепляемые соответственно лизоцимом (мурамидазой) и специфической мураэндопептидазой.

Полисахаридный каркас легко разрушается лизоцимом — энзимом животного происхождения. Пептидные связи являются мишенью для пенициллина, который ингибирует их синтез и препятствует формированию клеточной стенки. Количественное содержание пептидогликана влияет на способность бактерий окрашиваться по Граму. Бактерии, имеющие значительную толщину муреинового слоя (90–95%), стойко окрашиваются генцианвиолетом в сине-фиолетовый цвет и носят название грамположительных бактерий. Грамотрицательные бактерии с тонким слоем

пептидогликана (5–10%) в клеточной стенке после действия спирта утрачивают генцианвиолет и дополнительно окрашиваются фуксином в розовый цвет. Клеточные стенки у грамположительных и грамотрицательных прокариот резко различаются как по химическому составу (табл. 1), так и по ультраструктуре (рис. 13).

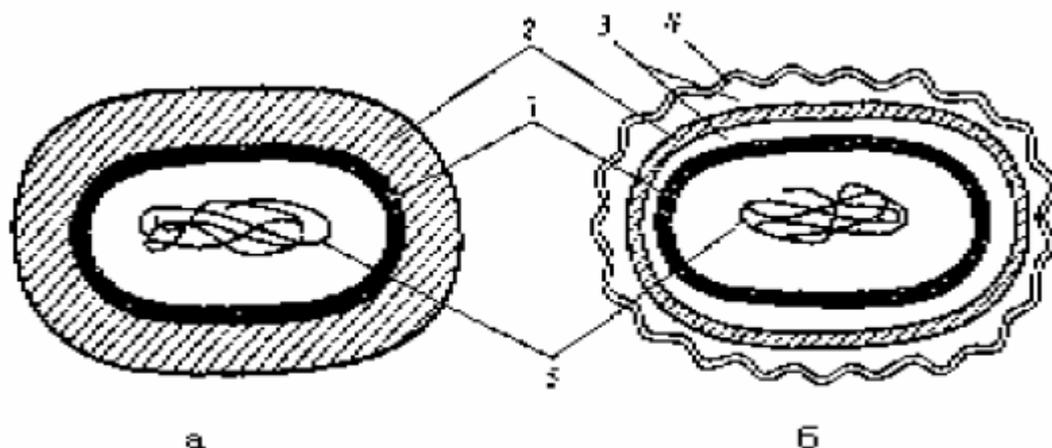


Рисунок 13. - Схематическое изображение клеточной стенки грамположительных (а) и грамотрицательных (б) прокариот:
1 – цитоплазматическая мембрана; 2 – пептидогликан; 3 – периплазматическое пространство; 4 – наружная мембрана; 5 – ДНК

Кроме пептидогликана, в клеточной стенке грамположительных бактерий содержатся тейхоевые кислоты (полифосфатные соединения), в меньшем количестве – липиды, полисахариды, белки.

Таблица 1. – Химический состав клеточных стенок грамположительных и грамотрицательных прокариот

Компоненты клеточной стенки	Грамположительные прокариоты	Грамотрицательные прокариоты	
		внутренний слой (пептидогликановый)	внешний слой (наружная клеточная мембрана)
Пептидогликан	+	+	–
Тейхоевые кислоты	+	–	–
Полисахариды	+	–	+
Белки	±	–	+
Липиды	±	–	+
Липополисахариды	–	–	+
Липопротеины	–	±	+

Грамотрицательные прокариоты имеют наружную мембрану, в состав

которой входят липиды (22%), белки, полисахариды, липопротеины. Клеточная стенка у бактерий выполняет в основном формообразующую и защитную функции, обеспечивает ригидность, формирует капсулу, определяет способность клеток к адсорбции фагов.

Все бактерии, в зависимости от их отношения к окраске по Граму, делятся на грамположительные и грамотрицательные.

Причину различного отношения бактерий к окраске по Граму объясняют тем, что после обработки раствором Люголя образуется нерастворимый в спирте комплекс йода с генциановым фиолетовым. Этот комплекс у грамположительных бактерий, в связи со слабой проницаемостью их стенки, не может диффундировать, в то время как у грамотрицательных – легко удаляется при промывании их этанолом, а затем водой.

Бактерии, полностью лишенные клеточной стенки, называются **протопластами**, они имеют шаровидную форму, обладают способностью к делению, дыханию, синтезу белков, нуклеиновых кислот, ферментов. Протопласты являются неустойчивыми структурами, очень чувствительными к изменениям осмотического давления, механических воздействий и аэрации, не обладают способностью синтезировать составные части клеточной стенки, не подвергаются инфицированию вирусами бактерий (бактериофагами) и не обладают активной подвижностью.

Если под влиянием лизоцима и других факторов происходит частичное растворение клеточной стенки, то бактериальные клетки превращаются в сферические тела, получившие название **сферопластов**.

Под воздействием некоторых внешних факторов бактерии способны терять клеточную стенку, образуя L-формы (названы в честь института им. Д. Листера, где были впервые выделены); подобная трансформация может быть спонтанной (например, у хламидий) или индуцированной, например, под воздействием антибиотиков. Выделяют стабильные и нестабильные L-формы. Первые не способны к реверсии, а вторые реверсируют в исходные формы после удаления причинного фактора.

Цитоплазматическая мембрана

Цитоплазма бактериальной клетки ограничена от клеточной стенки тонкой полупроницаемой структурой толщиной 5–10 нм, называемой цитоплазматической мембраной (ЦПМ). ЦПМ состоит из двойного слоя фосфолипидов, пронизанных белковыми молекулами (рис. 14).

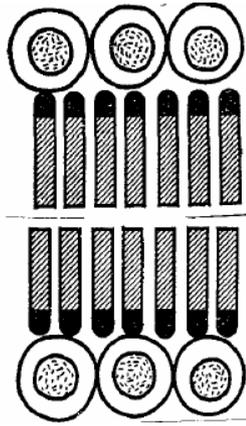


Рисунок 14. - Строение плазматической мембраны

Два слоя фосфолипидных молекул, обращенных гидрофобными полюсами друг к другу и покрытых двумя слоями молекул глобулярного белка.

С ЦПМ связаны многие ферменты и белки, участвующие в переносе питательных веществ, а также ферменты и переносчики электронов конечных стадий биологического окисления (дегидрогеназы, цитохромная система, АТФ-аза). На ЦПМ локализуются ферменты, катализирующие синтез пептидогликана, белков клеточной стенки, собственных структур. Мембрана является также местом превращения энергии при фотосинтезе.

Периплазматическое пространство

Периплазматическое пространство (периплазма) представляет собой зону между клеточной стенкой и ЦПМ. Толщина периплазмы составляет около 10 нм, объем зависит от условий среды и прежде всего от осмотических свойств раствора. Периплазма может включать до 20% всей находящейся в клетке воды, в ней локализуются некоторые ферменты (фосфатазы, пермеазы, нуклеазы и др.) и транспортные белки – переносчики соответствующих субстратов.

Цитоплазма

Содержимое клетки, окруженное ЦПМ, составляет цитоплазму бактерий. Та часть цитоплазмы, которая имеет гомогенную коллоидную консистенцию и содержит растворимые РНК, ферменты, субстраты и продукты обмена веществ, обозначается как *цитозоль*. Другая часть цитоплазмы представлена различными структурными элементами: мезосомами, рибосомами, включениями, нуклеоидом, плазмидами.

Рибосомы – субмикроскопические рибонуклеопротеиновые гранулы диаметром 15–20 нм. В рибосомах находится примерно 80–85% всей бактериальной РНК. Рибосомы прокариот имеют константу седиментации 70 S. Они построены из двух частиц: 30 S (малая субчастица) и 50 S (большая субчастица) (рис. 15).

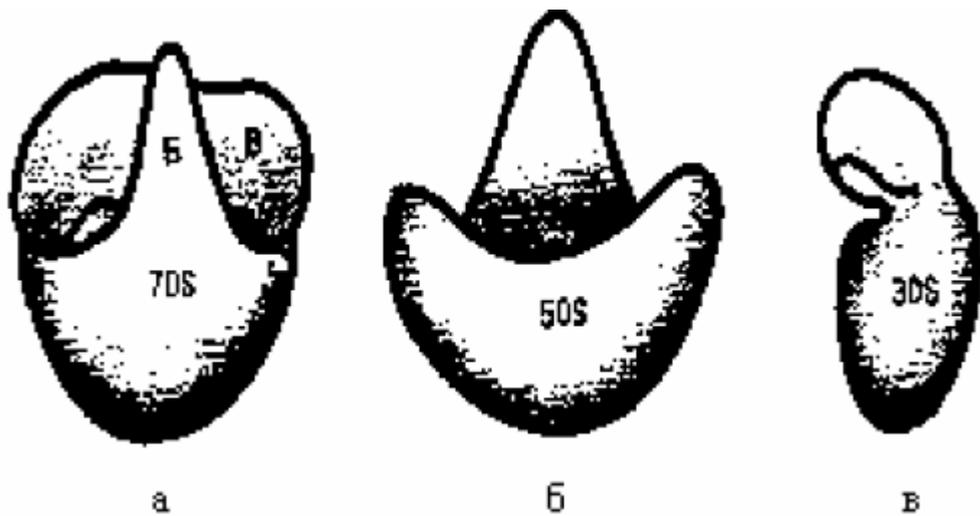


Рисунок 15. - Рибосома (а) и ее субчастицы – большая (б) и малая (в)

Рибосомы служат местом синтеза белка.

Цитоплазматические включения

Нередко в цитоплазме бактерий обнаруживаются различные включения, которые образуются в процессе жизнедеятельности: капельки нейтральных липидов, воска, серы, гранулы гликогена, β -гидроксимасляной кислоты (особенно у рода *Bacillus*). Гликоген и β -гидроксимасляная кислота служат для бактерий запасным источником энергии. У некоторых бактерий в цитоплазме находятся кристаллы белковой природы, обладающие ядовитым действием на насекомых. Некоторые бактерии способны накапливать фосфорную кислоту в виде гранул полифосфата (зерна волютина, метахроматические зерна). Они играют роль фосфатных депо и выявляются в виде плотных образований в форме шара или эллипса, располагающихся в основном у полюсов клетки. Обычно на полюсах бывает по одной грануле.

Нуклеоид

Нуклеоид – ядерный аппарат бактерий. Представлен молекулой ДНК, соответствующей одной хромосоме. Она замкнута, располагается в ядерной вакуоле, не имеет ограничивающей от цитоплазмы мембраны. С ДНК связано небольшое количество РНК и РНК-полимеразы. ДНК свернута вокруг центрального стержня, состоящего из РНК, и представляет собой высокоупорядоченную компактную структуру. Хромосомы большинства прокариот имеют молекулярную массу в пределах $(1-3) \cdot 10^9$, константу седиментации 1300–2000 S. Молекула ДНК включает $1,6 \cdot 10^7$ нуклеотидных пар. Различия в генетическом аппарате прокариотических и эукариотических клеток обуславливают его название: у первых – нуклеоид (образование, подобное ядру), в отличие от ядра у вторых.

В нуклеоиде бактерий содержится основная наследственная информация, которая реализуется в синтезе специфических белковых молекул. С ДНК бактериальной клетки связаны системы репликации, репарации, транскрипции и трансляции. Нуклеоид в прокариотической

клетке может быть выявлен в окрашенных препаратах с помощью светового или фазово-контрастного микроскопа.

У многих бактерий в цитоплазме обнаружены внехромосомные генетические элементы – плазмиды. Они представляют собой замкнутые в кольца двухцепочечные ДНК, состоящие из 1500–40000 пар нуклеотидов и содержащие до 100 генов.

Капсула

Капсула – слизистый слой клеточной стенки бактерий, состоящий из полисахаридов или полипептидов. Микрокапсулу (толщиной менее 0,2 мкм) способны формировать большинство бактерий.

Жгутики

Жгутики выполняют роль органа движения, позволяющего бактериям передвигаться со скоростью 20–60 мкм/сек. Бактерии могут иметь один или несколько жгутиков, располагающихся по всей поверхности тела либо собранных в пучки у одного полюса, у разных полюсов. Толщина жгутиков в среднем составляет 10–30 нм, а длина достигает 10–20 мкм.

Основу жгутика составляет длинная спиральная нить (фибрилла), которая у поверхности клеточной стенки переходит в утолщенную изогнутую структуру – крючок и прикрепляется к базальной грануле, вмонтированной в клеточную стенку и ЦПМ (рис. 16).

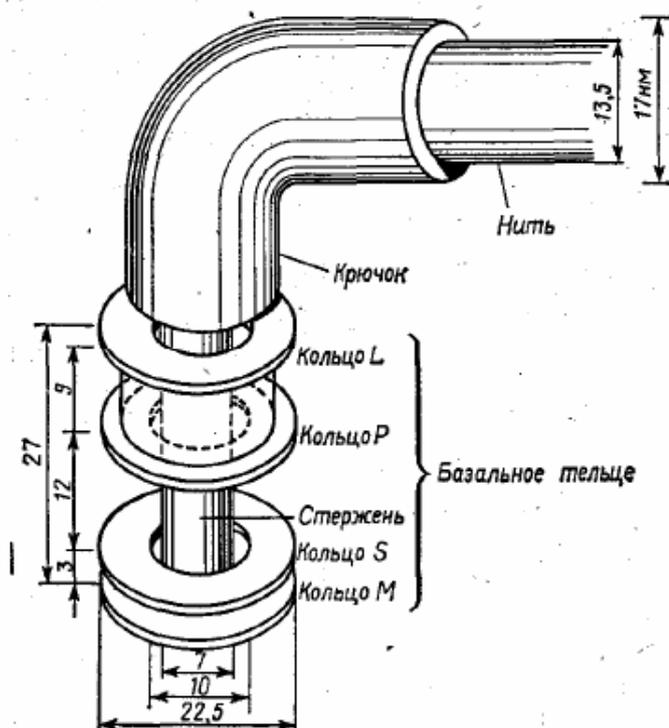


Рисунок 16. - Схематическая модель базального конца жгутика *E. coli*, основанная на электронных микрофотографиях выделенной органеллы

Базальные гранулы имеют диаметр около 40 нм и состоят из нескольких колец (одна пара – у грамположительных бактерий, четыре – у грамотрицательных прокариот). Удаление пептидогликанового слоя клеточной стенки ведет к потере способности бактерий к движению, хотя

жгутики при этом остаются неповрежденными. Жгутики почти полностью состоят из белка флагеллина с некоторым содержанием углеводов и РНК.

Споры

Некоторые бактерии в конце периода активного роста способны образовывать споры. Этому предшествует обеднение среды питательными веществами, изменение ее pH, накопление ядовитых продуктов метаболизма. Как правило, одна бактериальная клетка образует одну спору – локализация спор различна (центральная, терминальная, субтерминальная – рис. 17).

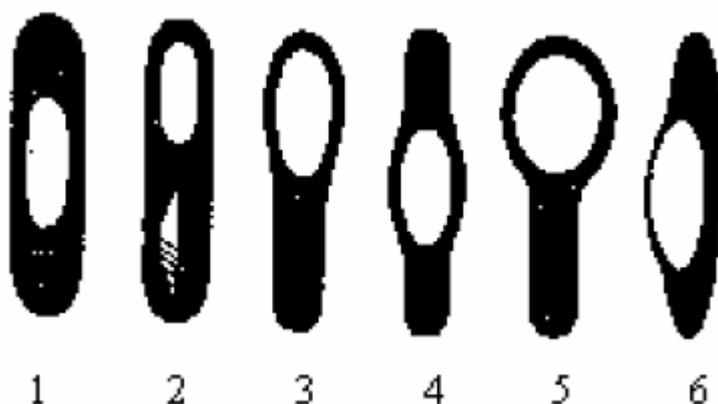


Рисунок 17. - Типичные формы спорообразующих клеток

Если размеры спор не превышают поперечного размера палочковидной бактерии, то последняя называется **бациллой**. Когда диаметр споры больше – бактерии имеют форму веретена и носят название **кловстридий**.

По химическому составу различие спор от вегетативных клеток состоит лишь в количественном содержании химических соединений. Споры содержат меньше воды и больше липидов.

В состоянии споры микроорганизмы метаболически неактивны, выдерживают высокую температуру (140–150°C) и воздействие химических дезинфицирующих веществ, длительно сохраняются в окружающей среде.

Попадая в питательную среду, споры прорастают в вегетативные клетки. Процесс прорастания спор включает три стадии: активации, начальной стадии и стадии роста. К активирующим агентам, нарушающим состояние покоя, относят повышенную температуру, кислую реакцию среды, механические повреждения и др. Спора начинает поглощать воду и с помощью гидролитических ферментов разрушает многие собственные структурные компоненты. После разрушения наружных слоев наступает период формирования вегетативной клетки с активацией биосинтеза, заканчивающейся делением клетки.

Морфология микробов–эукариотов: дрожжевых и плесневых грибов

Грибы (тип *Mycota*, *Mycetes*, *Fungi*) представлены одноклеточными или многоклеточными эукариотами, которые по наличию хитина в оболочке, стероидов в цитоплазматической мембране и гликогена в цитоплазме напоминают клетки животного происхождения, а по наличию клеточной стенки, состоящей из полисахаридов, близких к целлюлозе; по способности к

неограниченному росту, размножению спорами и неподвижностью в вегетативном состоянии – растения.

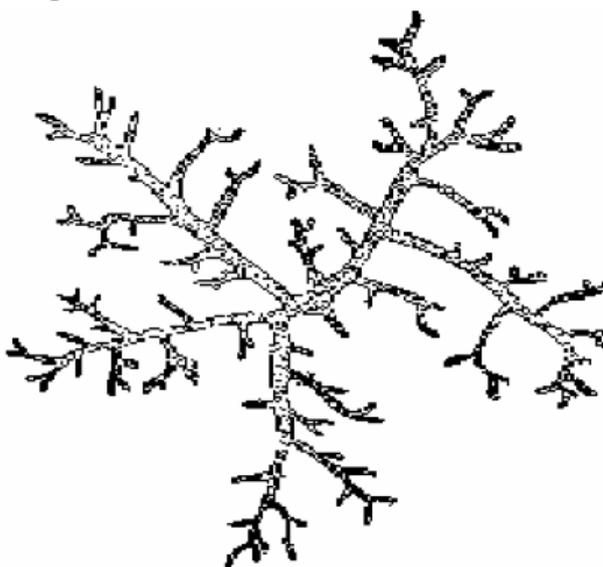


Рисунок 18. - Структура мицелия плесеней

У грибов существует 2 типа роста: гифальный рост (гифомицеты) и дрожжевой рост (бластомицеты). Обычно вегетативное тело гифомицетов состоит из нитей толщиной около 5 мкм, сильно разветвленных и называемых **гифами**. Гифы либо не имеют поперечных перегородок (у низших грибов), либо разделены перегородками на клетки (у высших грибов). Совокупность гифов образует мицелий – грибницу (рис.18). Мицелий может быть субстратный, образующийся в результате врастания гифов в питательную среду и воздушный, растущий на поверхности среды. Мицелий представляет ветвящиеся трубки, ветвление осуществляется боковыми выростами гиф. Переплетающиеся гифы с толстыми оболочками образуют склероции – округлые или неправильной формы образования размером от долей мм до нескольких см, предназначенные для выживания в неблагоприятных условиях (рис. 19).

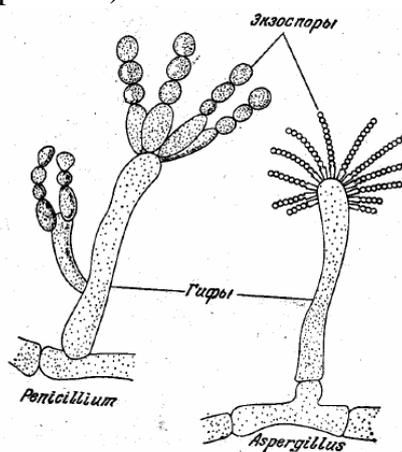


Рисунок 19. - Гифы *Aspergillus* и *Penicillium* двух промышленно важных плесеней

Кроме гифальных форм грибов, существуют и бластомицеты

(дрожжевые и дрожжеподобные грибы). Они представляют собой сферические или грушевидные формы размером 3–15 мкм. Эти клетки содержат включения гликогена и липиды, они способны к почкованию, делению, в результате которого клетки не распадаются, а образуют псевдомицелий.

Для многих видов грибов может быть характерен диморфизм, т. е. гифальная форма роста может переходить в дрожжеподобную. Ни один из вышеописанных морфологических элементов не является характерным для того или иного гриба. Комплексом разнообразных клеточных элементов определяется большой полиморфизм грибов в культурах на различных питательных средах. Тканевые формы грибов обычно представлены довольно однообразными спорами или мицелием, совсем не похожими на культуральные элементы грибов. В биотехнологии грибы используются как продуценты органических кислот (лимонной – *Aspergillus niger*), ферментов (амилаз – *Aspergillus oryzae*; пектиназ – *Aspergillus awanori*; каталазы – *Penicillium vitale* и др.), липидов, антибиотиков (пенициллина – *Penicillium notatum*; гризеофульвина – *Penicillium griseofulvum*), а также используются в пищевой промышленности (например, для созревания сыров рокфор и камамбер, получения вина, спирта, при хлебопечении и т. д.). В биомассе многих микроскопических грибов хорошо сбалансированы по аминокислотному составу белки; содержатся витамины и липиды. По питательным свойствам белки грибов приближаются к белкам сои и мяса. Их используют для приготовления кормовых концентратов и как добавку в пищу человека.

Методы микроскопического исследования микроорганизмов

Мельчайшие размеры микроорганизмов обуславливают использование для изучения морфологии бактерий точных оптических приборов – микроскопов. Наиболее часто применяются светлопольная микроскопия, микроскопия в темном поле, фазово-контрастная и люминесцентная микроскопия. Для специальных микробиологических исследований используется электронная микроскопия.

2. ТРАНСГЕННЫЕ ЖИВОТНЫЕ И РАСТЕНИЯ КАК НОВЫЕ ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Общие принципы конструирования новых организмов для биотехнологии

Трансгенные, или генетически модифицированные, организмы (ГМО) – это организмы, постоянный генетический материал которых был изменен методами генной инженерии. Эти методы широко известны, так же как технологии рекомбинантных ДНК или молекулярное клонирование. При использовании данных технологий молекулы ДНК из различных источников комбинируют в одну молекулу, образуя новый генный комплекс. Такая новая молекула называется рекомбинантной ДНК. Внедрение различными методами рекомбинантной ДНК в живой организм превращает его в генетически модифицированный. При этом рекомбинантные ДНК становятся составной частью генетического аппарата реципиентного организма и сообщают ему новые уникальные генетические, биохимические, а затем и физиологические свойства. Такая генетическая модификация, проводимая, как правило, в научных или хозяйственных целях для получения желаемых качеств изменяемого организма, отличается целенаправленным изменением генотипа организма, в отличие от случайных изменений, характерных для естественного и искусственного мутагенеза.

Следует отметить, что, как в любой новой области науки, в молекулярной биотехнологии в настоящее время существует некоторая терминологическая неопределенность. Так, если внедрение рекомбинантной ДНК происходит в хромосому, такой организм, как правило, называют трансгенным. Организмы, несущие рекомбинантную ДНК на внехромосомных элементах, например плазмидах, определяются как рекомбинантные. В то же время некоторые авторы не проводят различий между трансгенными и рекомбинантными организмами, а многие просто используют более общий термин «генетически модифицированные организмы».

Возможность конструировать новые гибридные молекулы ДНК *in vitro* возникла благодаря сделанным в середине XX в. открытиям, таким как установление комплементарной структуры ДНК, механизма ее репликации и репарации, расшифровка генетического кода, установление механизма переноса генетической информации в клетке, механизмов работы и регуляция генов и др.

Одним из наиболее значительных открытий, которые позволили развить генно-инженерные технологии, было идентификация и выделение рестрикционных эндонуклеаз, осуществляющих сайт-специфическое расщепление ДНК.

До этого открытия не существовало воспроизводимого метода фрагментации ДНК. Открытие ряда ферментов нуклеинового обмена: ДНК-лигазы, различные ДНК-полимеразы, обратные транскриптазы (ревертазы),

фосфатазы, полинуклеотидкиназы и другие – позволило получить инструменты для проведения различных манипуляций с фрагментами ДНК *in vitro*. Автоматический синтез олигонуклеотидов – коротких одноцепочечных ДНК (~10–40 оснований), используемых в основном как затравки (праймеры) для ДНК-полимераз, и разработка метода полимеразной цепной реакции существенно упростили все, сделав возможным клонирование и размножение молекул ДНК в пробирке. Другим важнейшим шагом для молекулярного клонирования было развитие методов секвенирования – быстрого определения нуклеотидной последовательности.

Основы генной инженерии были заложены в **1972–1973 гг.**, когда П. Берг (P. Berg) получил первые рекомбинантные ДНК, а С. Коэн (S. Cohen) и Г. Бойер (H. Boyer) разработали стратегию переноса функционально активных гибридных молекул ДНК в бактериальную клетку. Таким образом, был впервые осуществлен перенос функциональной единицы наследственности из одного организма в другой и перед человечеством возникли ошеломляющие перспективы конструирования новых форм жизни с полезными функциями.

Однако одним из первых откликов научного мира на создание новой технологии был запрет на некоторые биотехнологические эксперименты, считавшиеся потенциально опасными. Преобладали опасения, что при конструировании рекомбинантных ДНК случайно возможно создание организма с опасными свойствами. Группа видных ученых провела в 1975 г. знаменитую Асиломарскую конференцию по рекомбинантным молекулам ДНК для того, чтобы определить, как действовать безопасно. Впоследствии, с принятием инструкций по обеспечению безопасности генно-инженерных работ, многие ограничения были сняты, но до сих пор дискуссии о потенциальной опасности генетически модифицированных организмов остаются в центре внимания общества.

Также возникает ряд тревожных вопросов о применении современных технологий для создания биологического оружия. Например, сегодня ученые способны синтезировать любые последовательности ДНК. Возникает вопрос: смогут ли террористы воссоздавать вирусы, подобные оспе, или конструировать вирусы даже более смертоносные, чем птичий грипп и геморрагическая лихорадка Эбола? Поэтому в настоящее время многие с пониманием относятся к необходимости надлежащего контроля исследований в области биотехнологий.

Рестриктазы и другие ферменты для молекулярного клонирования

Инструментами в технологии рекомбинантных ДНК являются ферменты нуклеинового обмена и, прежде всего, эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы). Конструирование рекомбинантных ДНК стало возможным только после выделения высокоспецифичных бактериальных ферментов, которые узнают определенные последовательности оснований в двухцепочечной молекуле ДНК и расщепляют обе цепи в определенном месте. Эти ферменты называются эндонуклеазами рестрикции (рестриктазы)

II типа. Существует всего три типа эндонуклеаз рестрикции, но другие два не нашли широкого применения, поскольку не обладают необходимой специфичностью при расщеплении ДНК.

В природе рестриктазы являются компонентом системы рестрикции-модификации (Р-М-системы), которая служит защитным механизмом от чужеродной ДНК у микроорганизмов, например при вирусной (фаговой) инфекции. В Р-М-систему входят два фермента, специфичных для каждого штамма, – ДНК модифицирующий (метилтрансфераза, или метилаза) и ДНК расщепляющий (эндонуклеаза рестрикции), иногда обе эти функции объединены в одном белке. Эти два фермента способны специфически связываться с одной и той же последовательностью ДНК длиной 4–8 пар оснований, называемой сайтом узнавания и характерной для каждого конкретного микроорганизма. При этом метилтрансфераза, метилируя определенный нуклеотид в пределах сайта узнавания, защищает внутриклеточную ДНК от действия рестриктазы. В свою очередь, рестриктаза расщепляет фосфодиэфирные связи двухцепочечной ДНК в определенном месте участка узнавания или рядом с ним при отсутствии специфической модификации.

В настоящее время охарактеризована субстратная специфичность около 3,5 тыс. рестриктаз, из них имеется 238 (прототипы), узнающих уникальные нуклеотидные последовательности. Рестриктазы, узнающие одинаковые участки ДНК, составляют группу изошизомеров и могут отличаться по свойствам, в том числе по-разному расщеплять двухцепочечную ДНК. Более половины из известных рестриктаз узнают четырех-, шести- и восьминуклеотидные последовательности, являющиеся палиндромами – обращенными повторами (сайты с идентичными последовательностями нуклеотидов в направлении 5'→3' на комплементарных цепях ДНК, рис. 20).

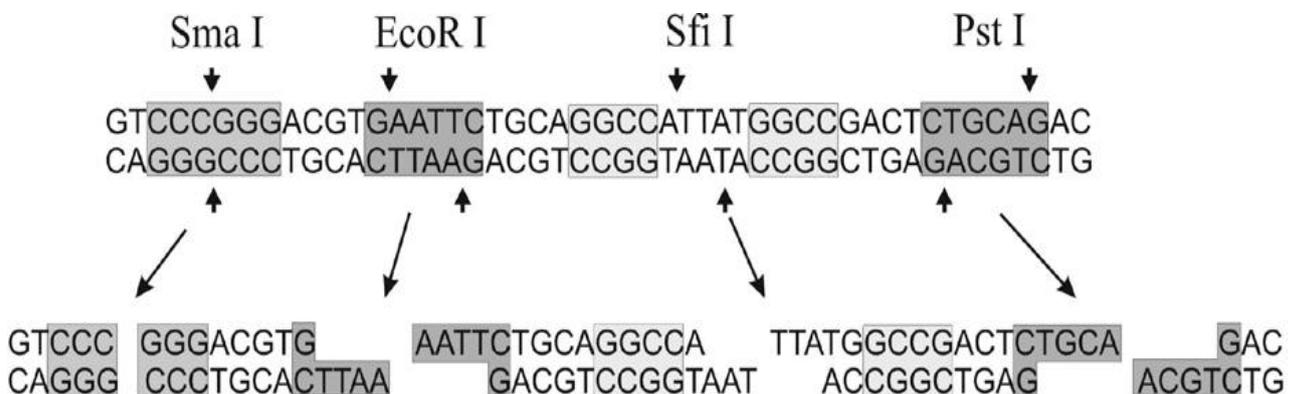


Рисунок 20. - Нуклеотидная последовательность, содержащая сайты расщепления для различных рестриктаз до и после обработки рестриктазами.

Для рестриктазы Sfi I последовательность из 5 нуклеотидных пар между узнаваемыми фрагментами может быть любой, но расщепляется всегда одинаково с образованием 5'-выступающих концов

Различные рестриктазы образуют различную форму концов при расщеплении ДНК, которые могут быть 5'-выступающими одноцепочечными (рис. 9, EcoR I, Sfi I), 3'-выступающими (Pst I) или полностью двухцепочечными – «тупыми» (Sma I). Выступающие одноцепочечные концы, если они комплементарны, получили название «липких», поскольку такие концы могут гибридизоваться. Молекулы ДНК из разных источников, обработанные одной и той же рестриктазой, расщепляющей палиндромные последовательности (например, EcoR I и Pst I), будут иметь одинаковые гибридизующиеся между собой липкие концы. Наличие липких концов у фрагментов ДНК существенно облегчает их ковалентное сшивание специальным ферментом ДНК-лигазой, который формирует фосфодиэфирную связь между соседними нуклеотидами через 5'-фосфатную и 3'-гидроксильную группы. Сам процесс называется лигированием. ДНК-лигаза в живой клетке выполняет ту же функцию – сшивание фрагментов ДНК, синтезирующихся при репликации.

Кроме молекулярного клонирования и физического картирования молекул ДНК (для создания рестрикционных карт ДНК), эндонуклеазы рестрикции также широко применяются в медицинской генодиагностике для выявления различных мутаций и в генетических популяционных исследованиях.

Другими группами ферментов, используемых при конструировании рекомбинантных ДНК, являются ферменты матричного синтеза – ДНК- и РНК-зависимые ДНК-полимеразы и ферменты, позволяющие осуществить нужные изменения структуры концов ДНК-фрагментов: полинуклеотидкиназы, фосфатазы, нуклеазы и другие ферменты для различных манипуляций с фрагментами ДНК.

Полимеразная цепная реакция

Появление метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в 1983 г. существенно продвинуло, ускорило и удешевило молекулярное клонирование, сделав возможным быстрый синтез (амплификацию) прямо в пробирке нужных последовательностей из считанных исходных копий. Впоследствии за изобретение ПЦР американский ученый К. Мюллис (K. Mullis) получил Нобелевскую премию.

ПЦР представляет собой серию из трех циклически повторяющихся стадий реакции (15–30 циклов по 1–3 мин):

- 1) тепловая денатурация исходной ДНК при ~94 °С;
- 2) отжиг ДНК-затравок (праймеров) при ~50–60 °С на получившиеся одноцепочечные матрицы;
- 3) синтез двухцепочечных ДНК при 72 °С с каждым из праймеров навстречу друг другу по противоположным цепям ДНК (рис. 21).

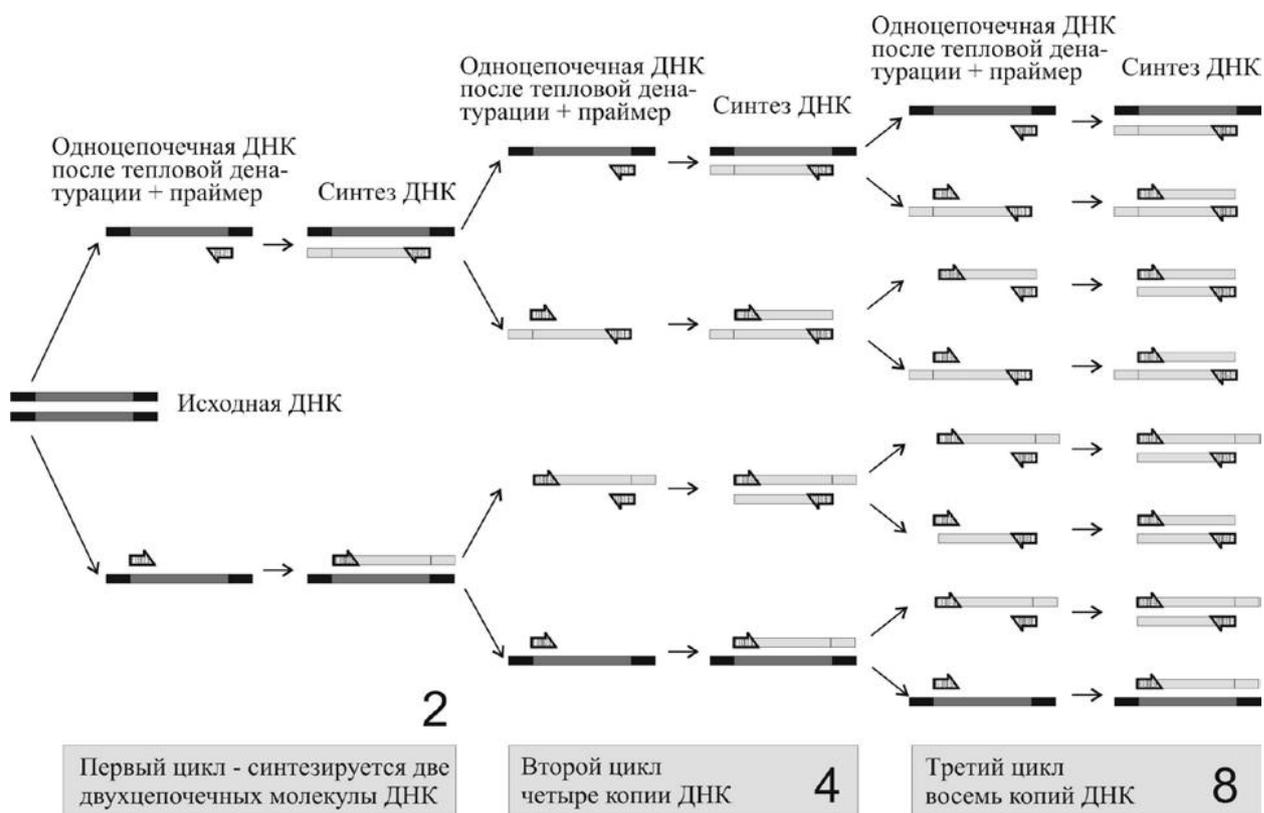


Рисунок 21. - Три цикла полимеразной цепной реакции, или амплификации ДНК

Серым цветом в исходной ДНК выделен целевой фрагмент для синтеза, который в процессе реакции ограничивается праймерами. В идеальных условиях реакции количество целевого фрагмента удваивается каждый цикл (2^n), количество исходных цепей увеличивается на две каждый цикл ($n + 2$, где n – количество циклов)

Реакцию проводят в специальном приборе – термоциклере, или амплификаторе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок. По завершении каждого цикла количество синтезированного продукта удваивается и происходит увеличение количества исходных копий ДНК в геометрической прогрессии. В качестве праймеров используются короткие (15–25 нуклеотидных оснований) одноцепочечные ДНК – олигонуклеотиды, комплементарные концам целевого фрагмента ДНК. Важнейшим компонентом ПЦР являются термостабильные ДНК-полимеразы, способные сохранять активность на протяжении всей реакции ПЦР, несмотря на воздействие высоких температур на стадии тепловой денатурации ДНК. В настоящее время имеется широкий спектр коммерческих полимераз с разнообразными свойствами, но пока наиболее используемой остается Taq-полимераза из термофильной бактерии *Thermus aquaticus* с оптимумом активности при $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ и ее смеси с другими ДНК-полимеразами.

В настоящее время ПЦР широко используется в научных и диагностических лабораториях во многих областях. Кроме простого удвоения последовательностей ДНК, метод ПЦР позволяет производить множество других манипуляций с генетическим материалом (введение мутаций, сращивание фрагментов ДНК), клонирование любых последовательностей в пробирке, выделение новых генов, секвенирование.

Также ПЦР широко используется в биологической и медицинской практике, в первую очередь, для диагностики заболеваний (наследственных, инфекционных), для установления отцовства, степени родства, популяционных исследований, в криминалистике – везде, где нужно установить уникальную последовательность ДНК, опираясь на минимальное количество исходного ДНК-содержащего материала.

Общая схема молекулярного клонирования

Технологии рекомбинантных ДНК – это совокупность процедур, позволяющих осуществить конструирование нового генного комплекса и перенос его в организм-реципиент, где новый генетический материал начинает работать. Не существует единого универсального набора методик, все зависит от конкретной задачи, но чаще всего эксперименты с рекомбинантной ДНК проводят по следующей схеме (рис. 14).

1. Получение нужной последовательности – ДНК для клонирования может быть получена химико-ферментативным синтезом, обратной транскрипцией мРНК и путем непосредственного расщепления геномной ДНК нужной рестрикционной эндонуклеазой. Но самый распространенный путь сейчас – синтез ДНК методом ПЦР. В настоящее время, когда секвенирование целых геномов различных организмов идет быстрыми темпами, сложно найти совсем неизвестный ген. Даже для млекопитающих, включая человека, секвенированы уже 25 геномов (по публичной базе данных NCBI Genome на август 2008 г.), из них 9 собраны полностью с установлением генной структуры. И это не считая расшифрованных геномов менее сложных организмов.

Учитывая генетическое родство всех живых организмов на Земле, самая распространенная ситуация в настоящее время – когда целевая последовательность для предполагаемого клонирования известна, хотя бы частично.

После выбора и синтеза праймеров к известной последовательности, ДНК можно амплифицировать методом ПЦР с использованием в том числе и вырожденных праймеров (с неполной комплементацией). В качестве матрицы для синтеза используют геномную ДНК или матричную РНК, в этом случае первым шагом в синтезе целевой последовательности будет синтез комплементарной ДНК (кДНК) обратной транскриптазой (ревертазой – РТ), затем обычная ПЦР. Иногда эти реакции объединяют в одну РТ-ПЦР (RT-PCR).

Как правило, в концы ПЦР-праймеров вводят сайты рестриктаз для удобства дальнейшего клонирования синтезированной последовательности (рис. 22).

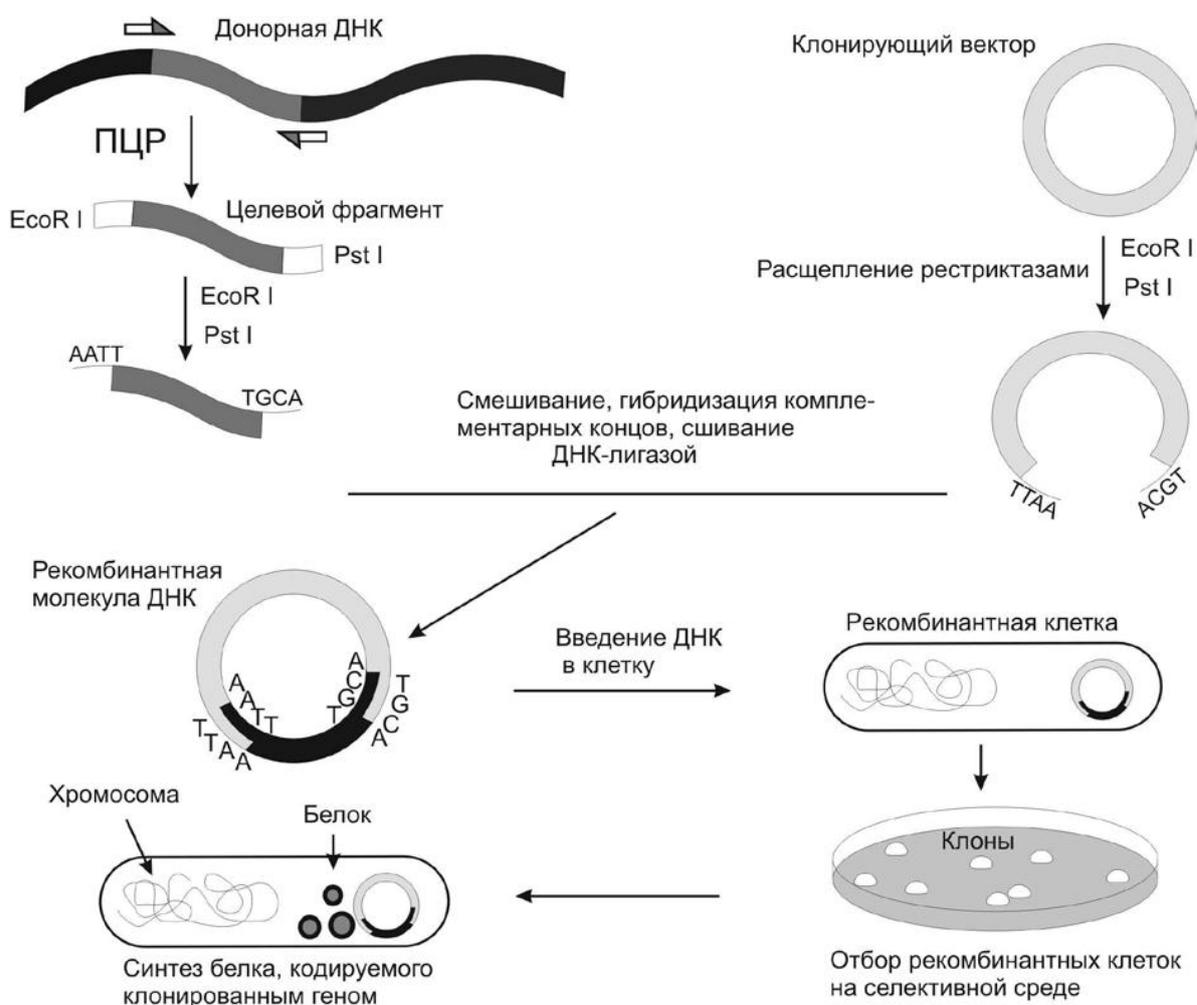


Рисунок 22. - Общая схема молекулярного клонирования на примере трансформации бактерий или дрожжей рекомбинантным плазмидным вектором

Нужную последовательность ДНК также можно получить химико-ферментативным синтезом, при этом производят сборку полноразмерного гена из отдельных синтетических олигонуклеотидов различными способами.

1. Химический синтез гена осуществляют, как правило, когда организм-донор ДНК не доступен или когда нуклеотидная последовательность природного гена может плохо транслироваться в выбранном организме-реципиенте вследствие несовпадения частоты использования кодонов, а также по другим причинам. Химико-ферментативный синтез гена можно заказать в ряде биотехнологических фирм, в том числе и в России.

2. После обработки рестриктазами полученный ген соединяют (лигируют) с клонирующим вектором с образованием новой, рекомбинантной молекулы – конструкция «клонировующий вектор – встроенная ДНК». Вектор для клонирования – общий термин, обозначающий молекулу ДНК, способную к включению чужеродной ДНК и к автономной репликации, служит инструментом для введения генетической информации в клетку. То есть является молекулой-носителем, подобно космической ракете-

носителю, для клонируемой ДНК.

3. Полученную рекомбинантную конструкцию вводят в клетку-мишень (реципиент), где она реплицируется и передается потомкам. Этот процесс называется трансформацией (в основном для прокариот и дрожжей) и трансфекцией (в случае эукариот). В зависимости от типа вектора и схемы эксперимента рекомбинантная ДНК может либо реплицироваться автономно, либо встроиться в хромосому клетки-хозяина.

4. Используя селективный маркер, идентифицируют и отбирают клетки, несущие рекомбинантную ДНК. Например, высевают трансформированные клетки на селективную среду с антибиотиком, ген устойчивости к которому несет использованный вектор – расти будут только колонии (клоны) рекомбинантных клеток.

5. Получают специфический белковый продукт, синтезированный клетками-хозяевами, что служит подтверждением клонирования искомого гена.

Основные типы клонирующих векторов

Как клонирующие векторы в генной инженерии используются плазмиды, вирусы и искусственные хромосомы. Самыми первыми векторами стали бактериальные плазмиды – внехромосомные автономно реплицирующиеся кольцевые молекулы ДНК. Следом для молекулярного клонирования стали использовать вирусы (фаги), которые в природе также могут захватывать и передавать ДНК от клетки к следующей клетке (трандукция ДНК). Появились различного ряда гибридные векторы, например гибриды фагов с плазмидами – фагмиды (phagemid). Для клонирования больших фрагментов ДНК были сконструированы искусственные хромосомы.

С развитием знаний о генетических элементах и совершенствованием методов генной инженерии новые векторы под конкретные задачи начали собирать из отдельных блоков – различных хорошо охарактеризованных генетических элементов. В настоящее время имеется огромное количество коммерчески доступных разнообразных синтетических векторов, сконструированных практически под любые задачи.

Различные типы клонирующих векторов обладают разным лимитом на размер вставок чужеродной ДНК. Основные типы современных векторов рассмотрены ниже.

Плазмидные векторы – кольцевые двухцепочечные молекулы ДНК, имеющие клонирующий лимит до ~10 тнп (тысяч пар нуклеотидов). Плазмиды найдены практически у всех исследованных бактерий, у некоторых до ~10 видов разных плазмид, каждая из них выполняет свои характерные функции.

Плазмиды также обнаружены у некоторых эукариот, например, у дрожжей – три типа различных плазмид. Некоторые плазмиды можно рассматривать как молекулярных паразитов, но многие кодируют важные функции, например, устойчивость к антибиотикам, тяжелым металлам,

способность усваивать определенные вещества. В одной клетке могут сосуществовать только плазмиды, принадлежащие к разным группам совместимости. Каждая плазида содержит сайт инициации репликации (ориджин, *ori*), специфичность которого определяет круг хозяев плазмиды, некоторые могут реплицироваться только в клетках одного вида, другие имеют широкий спектр хозяев. Размеры плазмид варьируют приблизительно от ~1 до 500 тпн. Каждая плазида имеет постоянную определенную копияность в клетке – количество молекул на клетку. На основе плазмид сконструировано огромное количество различных векторов, поскольку единственным обязательным элементом плазмиды является небольшой сайт инициации репликации, с остальной последовательностью можно проводить любые манипуляции.

Основным недостатком плазмидных векторов является их малая емкость в отношении клонируемых фрагментов ДНК. Выраженное делетирование больших вставок чужеродной ДНК в плазидах связано с тем, что селективное преимущество в бактериях получают плазмиды с минимальным временем репликации.

Вирусные векторы. Рассмотрим основные из них. Бактериофаг лямбда имеет линейную молекулу ДНК с 48,5 тпн. Емкость клонирующих векторов была существенно повышена с разработкой векторов на основе фага лямбда. Центральную треть вирусного генома можно заменить чужеродной ДНК без нарушения жизненного цикла фага, клонирующий лимит от 8 до 24 тпн, что составляет половину генома лямбды дикого типа (рис. 23). Механизм упаковки бактериофага в зрелые вирионы основан на включении ДНК строго определенного размера, что стабилизирует ДНК-вставки и позволяет легко освобождаться от нерекомбинантных молекул. Упаковку сконструированных *in vitro* молекул на основе фага лямбда производят в смеси бесклеточных экстрактов двух штаммов *E. coli*, лизогенных по бактериофагам с разными дефектами. Объединение бесклеточных лизатов обоих штаммов *E. coli* приводит к взаимной комплементации недостающих функций с помощью соответствующих белков дикого типа. Векторы на основе фага лямбда являются одними из самых распространенных для создания библиотек генов.

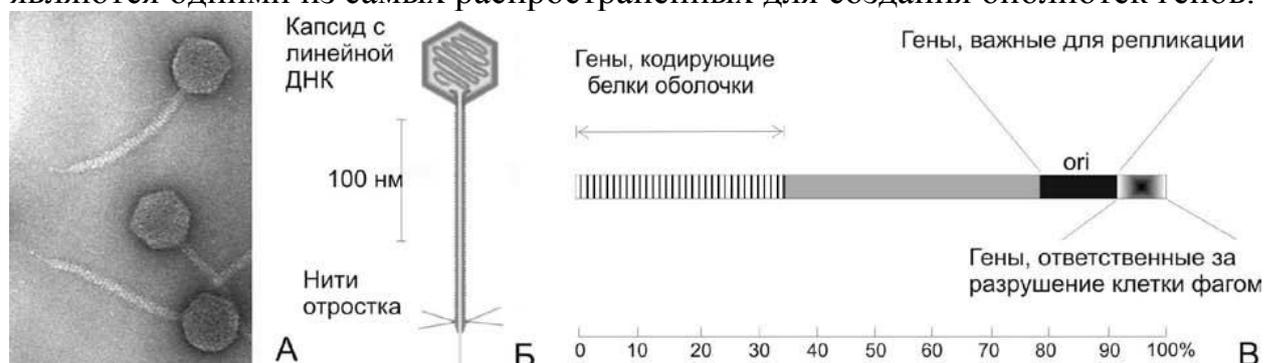


Рисунок 23. - Фаг лямбда под электронным микроскопом (а), схема его строения (б) и упрощенная генетическая карта (в). Выделенный серым цветом участок соответствует генам, несущественным для литического пути развития фага (гены, обеспечивающие существование в виде профага), вместо которых может быть встроена чужеродная ДНК

Космиды – кольцевые молекулы ДНК, объединяющие свойства фага и плазмиды, содержат ориджин репликации и *cos*-сайты фага лямбда. Сконструированы для клонирования больших фрагментов ДНК в 35–50 тпн. Для упаковки ДНК в фаговую головку вирусный аппарат фага лямбда требует только наличия *cos*-сайтов на расстоянии 36–51 тпн. Гибридные молекулы космиды с большими вставками в 35–50 тпн между *cos*-сайтами упаковываются *in vitro* в виде инфекционных вирионов при использовании экстрактов фагов дикого типа. Естественно, такие фаговые частицы нежизнеспособны, после инфекции космиды существуют в бактериальной клетке как плазмиды.

Нитевидные бактериофаги – M13 (рис. 24), fd, f1 бактерии *E. coli*.

Представляют собой одноцепочечную кольцевую ДНК, упакованную в белковую трубочку из одинаковых белковых субъединиц, двухцепочечная репликативная форма похожа на плазмиду. Вставки чужеродной ДНК до 1 тпн очень стабильны. Наиболее широко ранее использовались векторы на основе фага M13. До появления метода ПЦР, который позволяет секвенировать сразу двухцепочечные молекулы ДНК, одноцепочечные матрицы для секвенирования получали клонированием в M13-вектор. В настоящее время клонирование в векторы на основе M13 и fd преимущественно используют в методе фагового дисплея (получение и анализ пептидных библиотек для различных целей, например, для исследования белок-белковых, белок-пептидных, белок-ДНК взаимодействий, для эволюции белков *in vitro*, получения иммунологических реагентов нового поколения и др.). При этом чужеродную ДНК встраивают в гены белков вирусной оболочки, затем клонированные последовательности выявляются на поверхности вирусных частиц в виде гибридных белков (фьюжин-белков).

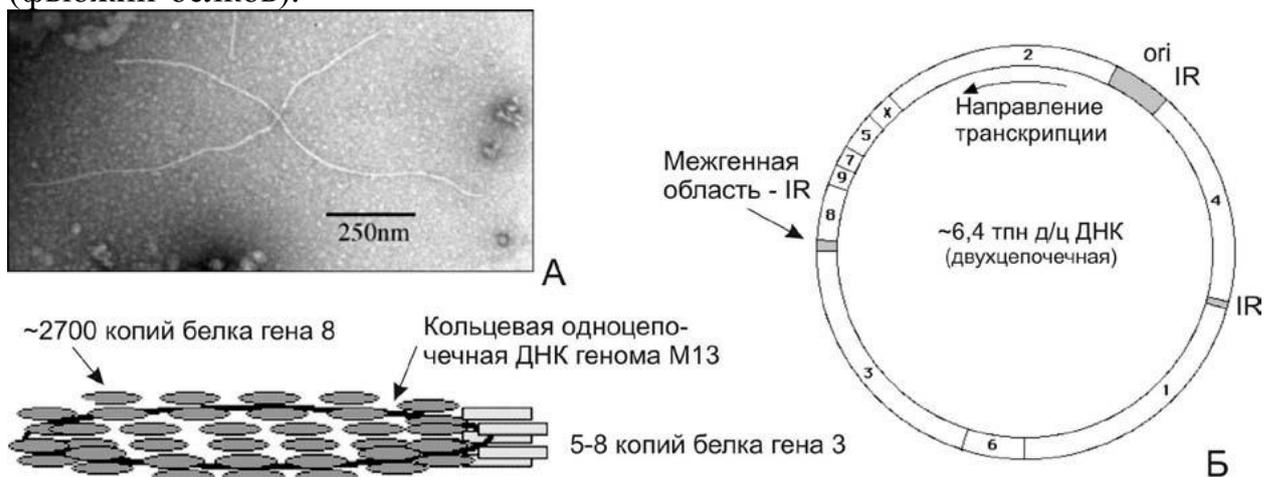


Рисунок 24. - Нитевидный бактериофаг M13 под электронным микроскопом (а) и упрощенная схема его строения. На геномной карте (б) затемненные области отмечают несущественные для жизнеспособности вируса участки, куда возможна вставка чужеродной ДНК. Удлинение генома рекомбинантного фага при инсерции чужеродной ДНК приводит к образованию более длинных нитей вирионов, чем у фага дикого типа

Бакуловирусы – большая и разнообразная группа вирусов. Поражают

насекомых и других членистоногих, но абсолютно безвредны для позвоночных. Геном представлен кольцевой двухцепочечной ДНК, варьирующей в размере от 80 до 180 тпн. Замена несущественной для репликации части вирусного генома позволяет клонировать чужеродную ДНК до 15 тпн. Внедрение чужеродной ДНК происходит путем гомологичной рекомбинации (двойной кроссингвер) бакуловируса с небольшим плазмидным транспортным вектором, содержащим клонированный ген. Данная система экспрессии позволяет осуществлять большинство посттрансляционных модификаций (гликозилирование, ацилирование, протеолитическое расщепление и др.), недоступных в прокариотической системе. В настоящее время векторы на основе бакуловирусов широко используются для продукции различных эукариотических белков в клетках насекомых. Также бакуловирусы применяются как биологические инсектициды.

Искусственные хромосомы. Разработка векторов типа искусственных хромосом началась для решения задачи клонирования и стабильного наследования больших фрагментов ДНК, например, для физического картирования генома в проектах расшифровки геномов, для стабильной экспрессии обширных генных комплексов в трансгенных клетках, для внедрения таких комплексов и отдельных генов в клетку-мишень без нарушения ее хромосомных структур и т.д.

Бактериальные искусственные хромосомы (bacterial artificial chromosomes – BAC) сконструированы на основе полового фактора F *E. coli* со строгим контролем репликации. Его генетическая система обеспечивает правильное распределение фактора F между делящимися клетками и поддерживает его копийность в 1-2 молекулы на клетку. BAC-векторы позволяют клонировать фрагменты ДНК в 75–300 тпн.

Дрожжевые искусственные хромосомы (yeast artificial chromosomes – YAC) – линейная ДНК, которая имеет все необходимое для репликации в дрожжах: теломеры, несколько сайтов инициации репликации (репликонов), дрожжевую центромеру (рис. 25). Также дополнительно содержит селективный маркер для идентификации и поддержания популяции рекомбинантных клеток. Клонированный лимит – 100–1 000 тпн. Бактериальные и дрожжевые искусственные хромосомы применяют для создания геномных библиотек.

Причем, структурная стабильность протяженных вставок ДНК в BAC-системе существенно выше, чем в YAC-системе, чем обусловлено широкое использование BAC-системы при физическом картировании генома человека, по которому затем собиралась его полная последовательность.

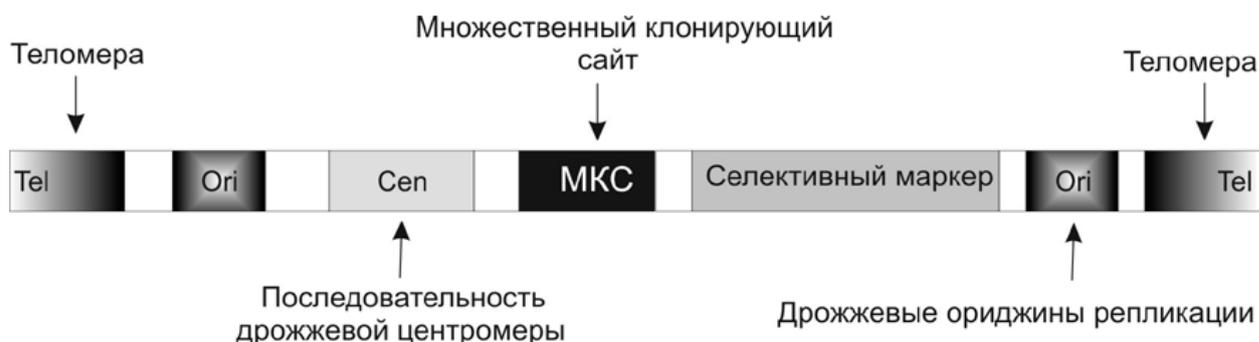


Рисунок 25. - Основные элементы конструкции дрожжевой искусственной хромосомы

Дальнейшее развитие этого направления привело к созданию векторов на базе искусственных хромосом млекопитающих (mammalian artificial chromosomes – MAC). Благодаря наличию основных структурных элементов обычных хромосом такие мини-хромосомы длительно удерживаются в клетках и способны нести полноразмерные (геномные) гены и их естественные регуляторные элементы, которые необходимы для правильной работы гена, в нужной ткани и в должное время.

Определяющим в выборе вектора для молекулярного клонирования является поставленная цель и предполагаемый организм-хозяин. Даже если в качестве окончательного хозяина рекомбинантной ДНК планируется совсем другой организм, генетические конструкции собирают, мутируют и нарабатывают, как правило, в *E.coli* с использованием специализированных бактериальных векторов, затем субклонировать в вектор для окончательного хозяина.

Иногда удобно использовать челночный, или шаттл-вектор (shuttle vector), с двумя сайтами инициации (ориджинами) репликации, способный реплицироваться в обоих хозяевах, ориджины которых он содержит. Несмотря на все имеющееся разнообразие векторов, большинство укладывается в общую схему бактериального клонирующего вектора (рис. 26). Вектор, содержащий необходимые элементы для трансляции клонируемой ДНК (экспрессионная кассета с сигналами транскрипции и трансляции, часто репрессор промотора), называется экспрессионным.

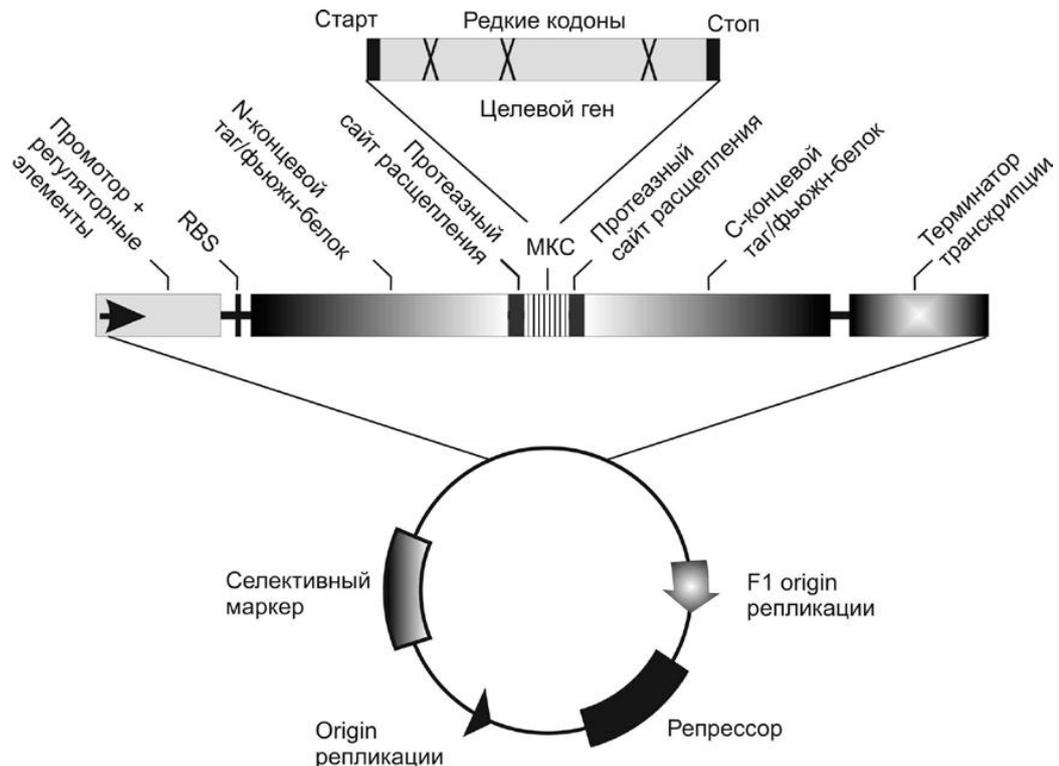


Рисунок 26. - Общая схема типичного экспрессионного бактериального вектора

Доставка рекомбинантной ДНК и РНК в клетку

В настоящее время известно около 40 различных способов доставки рекомбинантной ДНК в клетки, по-разному решающих проблему преодоления плазматической мембраны. Пока не существует единой классификации методов доставки рекомбинантной ДНК в клетки. Каждый автор обзоров классифицирует по-своему, возможно, потому, что для многих эмпирически найденных методов механизм преодоления мембраны не ясен до сих пор, например для трансформации. С терминологией также существует неопределенность, что неудивительно для бурно развивающейся новой области науки и практики.

Каждый из методов доставки чужеродной ДНК в клетки имеет свои особенности, преимущества и недостатки в отношении выживаемости клеток, эффективности введения, универсальности, возможностей технического осуществления. Выбор метода зависит от типа клеток-хозяев и типа использованного вектора, а также от личных предпочтений и возможностей экспериментатора. Ниже подробно рассмотрены некоторые наиболее известные способы доставки ДНК в клетки-мишени.

Трансформация в самом общем значении – это процесс введения свободной ДНК в клетку. В более узком значении термин применяется в основном по отношению к бактериям, обозначая процесс поглощения рекомбинантной ДНК компетентными клетками, индуцированный температурным фазовым переходом клеточной мембраны. *E. coli* является самым распространенным организмом при работе с рекомбинантными ДНК, и чтобы обеспечить внедрение в клетки плазмидной ДНК, клетки выдерживают с ледяным раствором CaCl_2 и ДНК, а затем подвергают

тепловому шоку при 42 °С в течение ~1 мин. По-видимому, в результате такой обработки происходит локальное разрушение клеточной стенки. Эффективность трансформации, которая определяется как число трансформантов на 1 мкг добавленной ДНК, при этом составляет примерно 105–107. Эффективность этого метода невысока, приблизительно менее 0,1 % клеток оказываются трансформированными, но этот недостаток компенсируется применением схем отбора, позволяющих быстро идентифицировать нужные клоны.

Клетки, способные поглощать чужеродную ДНК, называются компетентными. Доля этих клеток в популяции обычно очень мала, но ее можно повысить, используя специальную питательную среду, условия культивирования и химические индукторы компетентности (подобранные, как правило, эмпирически). Часто используемый этап подготовки компетентных клеток получение сферопластов – клеток, частично или полностью (протопласты) лишенных наружной ригидной клеточной стенки. Например, только таким способом была осуществлена эффективная трансформация многих грамположительных бактерий родов *Bacillus*, *Listeria*, *Streptomyces* и др. Некоторые методики трансформации дрожжей также включают стадии ферментативного удаления оболочки дрожжевой клетки с помощью глюкозидаз. Для организмов, устойчивых к химическим индукторам компетентности или не обладающих природной компетентностью, применяются другие системы доставки ДНК.

Конъюгация. Существуют бактериальные плазмиды (конъюгативные плазмиды), обладающие способностью создавать межклеточные контакты, через которые они и переходят из одной клетки в другую. Образование контактов между донорной и реципиентной клетками обеспечивается конъюгативными свойствами плазмид, а сам перенос ДНК – мобилизационными. При этом конъюгативная плаزمида может увлекать за собой обычный плазмидный вектор, находящийся в той же клетке. Таким образом можно трансформировать клетки-реципиенты, с трудом поддающиеся трансформации другими способами. Например, показан мобилизационный перенос челночного вектора pAT187 с широким кругом хозяев из *E. coli* в различные грамположительные бактерии (родов *Bacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* и др.), хотя и с намного меньшей эффективностью, чем для переноса между разными штаммами *E. coli*. Более того, недавно была продемонстрирована возможность конъюгативного переноса ДНК из бактериальных клеток в культивируемые клетки животных. В процессе конъюгации переносится только одна цепь донорской плазмиды, на которой затем синтезируется вторая цепь. Это приводит к тому, что конъюгативно передаваемая плазмида не подвергается атаке хозяйских рестриктаз. Эффективность этого метода для бактерий сопоставима с трансформацией.

Вирусная инфекция. Для внедрения векторов на основе вирусов широко используется природный инфекционный путь заражения клетки-хозяина, который зависит от типа вируса.

Перфорационные методы. Одним из популярных методов введения нуклеиновых кислот в клетки-мишени является электропорация – временное создание пор в бислоидной липидной мембране под кратким воздействием электрического поля. Является универсальным физическим методом трансформации, методика которого разработана практически для всех типов клеток. При работе с *E. coli* подготовленную клеточную суспензию (~50 мкл) и ДНК помещают между электродами и подают единичный импульс тока длительностью ~4,5 мс при напряжении 1,8 кВ, расстояние между электродами составляет 1 мм. После такой обработки эффективность трансформации повышается до 10⁹–10¹¹ для малых плазмид (~3–6 тпн) и до 10⁶ для больших (~135 тпн). Аналогичные условия используют для введения в *E. coli* вектора ВАС. Электропорирующий эффект высоковольтного разряда на бислоидную липидную мембрану, по-видимому, зависит от радиуса ее кривизны. Поэтому мелкие бактериальные клетки эффективно поглощают ДНК при значительно большей напряженности (12–18 кВ/см), чем крупные животные и растительные клетки, эффективно поглощающие ДНК при напряженности поля 1-2 кВ/см.

Электропорация – наиболее простой, эффективный и воспроизводимый метод введения молекул ДНК в клетки, требующий, однако, специального прибора электропоратора.

Другие перфорационные методы доставки ДНК в клетку: обработка клеток ультразвуком, соскабливание клеток с субстрата в присутствии экзогенного материала, центрифугирование клеток в среде с ДНК в сочетании с электропорацией, осмотическая перфорация плазматической мембраны, пробой клетки лазерным микролучом, использование порообразующего токсина стрептолизина-О.

Трансфекция. Первоначально этот термин обозначал введение в клетки вирусной ДНК, сейчас его значение расширилось до обозначения введения любой чужеродной ДНК в клетки эукариот. Термин «трансформация», обозначающий процесс введения ДНК в клетку для прокариот и дрожжей, оказалось, использовать неудобно, поскольку применительно к животным клеткам трансформация – это превращение нормальных клеток в раковые. В узком смысле под трансфекцией в основном понимают введение ДНК в эукариотические клетки с помощью различных химических реагентов.

Одним из первых разработанных методов эффективной трансфекции была инкубация ДНК с ДЕАЕ-декстраном. Полученная эффективность была сопоставима с трансформацией бактерий и достигала 10⁶ трансфектантов на мкг ДНК. Механизм действия ДЕАЕ-декстрана окончательно не установлен, но известно, что он связывается с ДНК и с клеточной мембраной, стимулируя пиноцитоз (рис. 19), хотя сам клетками не захватывается. К недостаткам метода стоит отнести токсичность ДЕАЕ-декстрана для некоторых типов клеток, зависимость эффективности от качества препарата, очень малую частоту получения стабильных трансфектантов.

Эффективность трансфекции удалось повысить в 10–100 раз инкубацией клеток с осажденной фосфатом кальция ДНК. Плотные частицы

кальциевого преципитата ДНК поглощаются клеткой путем фагоцитоза (рис. 27), но при этом только небольшая часть проникших молекул достигает ядра и встраивается в хромосомную ДНК. Кальций-фосфатный метод более эффективен и дешев, но вызывает разрыв молекул ДНК, что переводит кольцевые молекулы в линейную форму, иногда неинфекционную в случае трансфекции вирусов. Кроме того, условия кальций-фосфатной трансфекции приходится подбирать для каждой клетки-мишени индивидуально.

ЭНДОЦИТОЗ

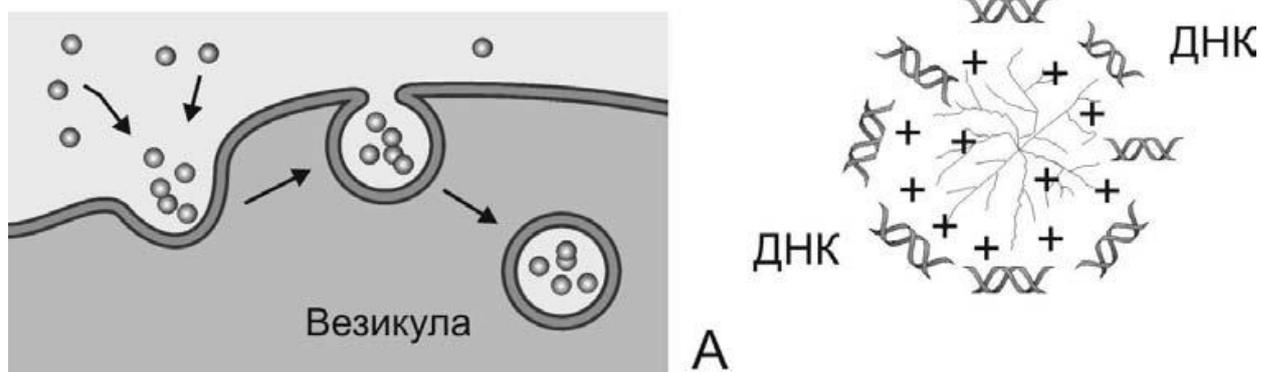


Рисунок 27. - Схема введения ДНК в составе различных комплексов в клетку путем эндоцитоза: фагоцитоза и пиноцитоза (а). Схематичное изображение частицы из нелипидного поликатиона в дендроформе со связавшейся ДНК, отрицательный заряд которой компенсируется катионным полимером (б)

В ходе поисков других трансфецирующих реагентов было выявлено, что полимерные молекулы, несущие избыточный катионный заряд, могут существенно повысить эффективность трансфекции. Полимерные катионы образуют с нуклеиновыми кислотами устойчивые комплексы с нейтрализованными зарядами, которые могут с высокой эффективностью транспортировать ДНК и РНК внутрь клетки, защищая от действия эндонуклеаз на пути к ядру (рис. 28). Синтетические нелипидные полимерные катионы в линейной или разветвленной конформации (дендритная форма) могут конденсировать ДНК и РНК в относительно малые частицы, которые затем связываются с клеточной мембраной и проникают в клетку путем неспецифического эндоцитоза. В настоящее время для трансфекции из группы нелипидных поликатионов используются в основном полиэтиленимин, полиамидоамины и дендримеры на их основе, катионные белки типа полилизина, протамина и гистонов, а также различные коммерческие продукты, например РАМАМ.

Революцией явилось введение в практику первого низкотоксичного катионного липида ДОТМА (1,2-диолеил-3-N,N,N-триметиламинопропан), синтезированного Фелгнером (Felgner, 1987) с соавторами. Эффективность трансфекции с использованием катионного липида (рис. 29) была приблизительно в 100 раз больше относительно любого другого химического реагента, причем с большой долей стабильных трансгенных клеток.

интеграцией и экспрессией инъецированных генов может достигать 50 %. Преимущество описываемого метода заключается также в том, что он позволяет вводить любую ДНК в любые клетки и для сохранения в клетках введенного гена не требуется никакого селективного давления.

Баллистическая трансфекция, биобаллистика, или биолистика (бомбардировка микрочастицами), основана на обстреле клеток микросферами размером около 1-2 мкм, покрытых ДНК. Применяются микрочастицы золота, вольфрама (иногда бывает фитотоксичен), силикона и различные синтетические наносферы. Микрочастицы, покрытые ДНК, проходят через клеточные слои и переносят генетическую конструкцию непосредственно в органеллы и ядра клеток. Созданный для этой цели «генный пистолет» (gene gun), или «генная пушка», который был разработан Д. Сенфордом (J. Sanford) в 1987 г. для введения ДНК в зерна хлебных злаков, по своему устройству сходен с пневматическим оружием (рис. 30).

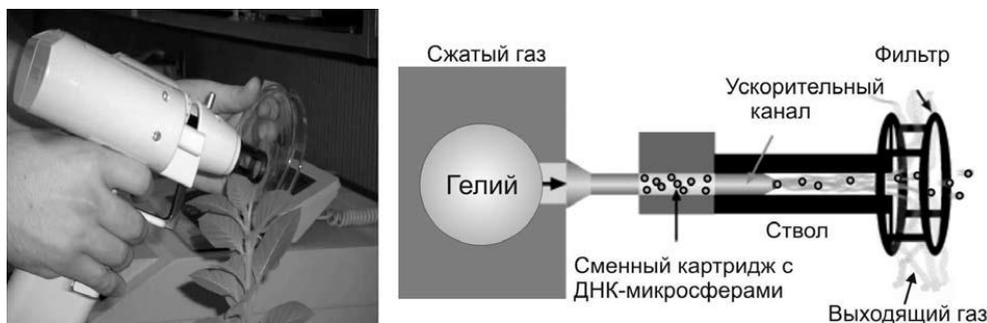


Рисунок 30. - Введение рекомбинантной ДНК в листья растения с помощью многозарядного «генного пистолета» фирмы Bio-Rad (а) и его общая схема (б)

Выделение генетически модифицированных организмов и проблема удаления маркерных генов

Поскольку эффективность введения рекомбинантной ДНК в клетку никогда не бывает 100 %, а эффективность получения стабильных трансгенных клеток вообще очень мала, всегда используются различные методы селекции для выделения трансформированных клеток. В состав рекомбинантных генетических конструкций вводят специальные гены селекции, например, гены устойчивости к антибиотикам и/или репортерные (маркерные) гены, кодирующие какой-либо легко идентифицируемый признак (окраска клеток генами флуоресцентных белков). При низкой эффективности трансфекции очень удобно использовать гены устойчивости к антибиотикам, тяжелым металлам и другим веществам, а также различные гены метаболизма, придающие только трансформированным клеткам способность расти на селективной среде.

Если эффективность трансфекции достаточно высока, можно проводить отбор полученных трансформантов с помощью прямого анализа ДНК (например, методом ПЦР) и в этом случае можно обойтись без генов селекции. Часто репортерный ген необходим наряду с селективным геном, по которому идет отбор трансформантов, для оценки уровня экспрессии

целевого гена.

Полученные в одном эксперименте трансгенные организмы могут сильно различаться по уровню экспрессии чужеродного гена, вследствие различного встраивания в геном клетки-хозяина и различного состояния геномов после такого встраивания.

Задача получения трансгенных организмов для хозяйственных целей включает в себя также получение коммерциализированных трансгенных организмов без каких-либо селективных и/или маркерных генов. Это обусловлено несколькими причинами:

1. Потребность минимизировать воздействие на уже сформированный в процессе длительной эволюции генетический аппарат клетки-хозяина и убрать дополнительную метаболическую нагрузку клетки на экспрессию маркерного гена. Все это необходимо для стабилизации самого трансгенного организма и его приобретенного признака, а также для повышения его жизнеспособности.

2. Озабоченность общественного мнения неконтролируемым распространением в окружающей среде селективных и маркерных генов и, прежде всего, генов устойчивости к антибиотикам. Эти опасения можно считать реальными только в случае трансгенных микроорганизмов, поскольку ни один факт природной передачи генов от высших растений или животных к микроорганизмам науке не известен. Кроме того, селективные гены взяты из природных популяций микроорганизмов, где они сейчас широко распространены в результате активного применения антибиотиков в медицинской практике.

Поэтому вероятность попадания гена устойчивости к антибиотику в микрофлору человека из природного резервуара несравнимо реальнее, чем, например, при употреблении трансгенных растений. Однако, учитывая настроения общественности, разрабатываются подходы для исключения присутствия «подозрительных» генов в трансгенных формах.

3. Проблемы у потребителей ГМО, вызванные в редких случаях балластным продуктом маркерного гена, например, аллергические реакции на продукт маркерного гена у животных и человека при потреблении генетически модифицированных растений. Хотя в этом случае возникновения проблемы можно не допустить использованием в качестве маркеров генов из традиционных пищевых источников.

4. Необходимость удаления маркерного гена, уже использованного для селекции. Это важно при последовательном введении нескольких генетических конструкций в один организм, поскольку количество эффективных селективных генов ограничено.

Трансгенные микроорганизмы и клеточные культуры

Микроорганизмы с древних времен участвовали в биотехнологических процессах в различных сферах практической деятельности человека, таких как хлебопечение, виноделие, приготовление кисломолочных продуктов и т.д.

Эта разнородная группа микроскопических организмов, искусственно объединенная на основании размера, стала базой многочисленных хозяйственных биотехнологических производств, сложившихся в промышленную микробиологию. Быстрый рост и огромное генетическое разнообразие микроорганизмов позволяют за короткий промежуток времени осуществить синтез больших количеств целевого продукта в строго контролируемых условиях.

Возникновение генной инженерии в середине 1970-х гг. (перенос чужеродных генов, придающих новые полезные свойства организму хозяина) придало огромный импульс развитию биотехнологических производств.

Возможность конструировать организмы с заданными свойствами видоизменила структуру и содержание промышленной микробиологии. Во-первых, существенно повысилась продуктивность промышленных микроорганизмов – продуцентов классических продуктов посредством усовершенствования имеющегося метаболического пути (введения дополнительных генов, увеличения их количества или активности). Во-вторых, внедряя в микробную клетку чужеродные гены, удалось получить микроорганизмы, синтезирующие несвойственные им вещества, например, белки крови человека (интерфероны, интерлейкины, инсулин и др.), что значительно увеличило разнообразие биотехнологической продукции.

Таким образом, стало возможным преобразование клеток бактерий, дрожжей и млекопитающих в «фабрики» для масштабного производства антибиотиков, белков, жиров, аминокислот, а также для получения безопасных и дешевых вакцин. Практически любое современное биотехнологическое производство основано на использовании трансгенных организмов.

Рекомбинантные микроорганизмы для получения коммерческих продуктов

Именно бактерии стали первыми ГМО благодаря простоте организации их генома и манипуляций с клетками. Первый патент на генетически модифицированный штамм микроорганизмов, который был способен разлагать нефть, был выдан в США в 1980 г. всего через 8 лет после работы Берга по конструированию рекомбинантной ДНК. Еще через два года был разрешен для клинического использования синтезированный в бактерии *E. coli* первый лекарственный препарат – рекомбинантный человеческий инсулин. Сейчас промышленная микробиология с использованием ГМ микроорганизмов развивается в основном по следующим направлениям:

1) производство продуктов биосинтеза трансгенных микроорганизмов, например, антибиотиков, гормонов, ферментов и витаминов;

2) использование биомассы микроорганизмов – производство медицинских вакцин, различных дрожжей, белково-витаминных концентратов и заквасок для получения кисломолочных продуктов и силосования кормов;

3) биотехнологии, основанные на уникальных способностях некоторых

бактерий производить органические кислоты, этанол, углеводы и метан. Сюда же можно отнести и переработку некоторых отходов с возможностью получения полезных соединений, в первую очередь горючих газов (биотипливо).

Использование трансгенных микроорганизмов в медицине. В настоящее время биотехнология на основе использования трансгенных микроорганизмов предлагает новые подходы к разработке и производству фармацевтических препаратов, а также позволяет выпускать в достаточных количествах широкий спектр лекарственных средств, которые раньше были малодоступны. Среди примерно 40–50 новых видов лекарств, вакцин и препаратов для диагностики, появляющихся на рынке ежегодно, 10–15 получены с помощью генно-инженерных методов, причем многие из них предназначены для лечения болезней, которые ранее считались неизлечимыми.

К самому большому классу лекарств, получаемых путем микробного синтеза, относятся антибиотики. По разнообразию и показаниям к применению они занимают первое место среди продукции мировой фармацевтической промышленности. Сегодня известно более 6 000 видов антибиотиков, более 100 из которых находят применение в медицинской практике, в том числе при лечении таких тяжелых заболеваний, как туберкулез, менингит, плеврит, пневмония. Отдельные антибиотики, такие как блеомицин, применяют при лечении онкозаболеваний. Объем мирового рынка антибиотиков увеличивается в последнее время на 10–20 %/год и составляет более 23 млрд дол.

Вторым классом лекарственных препаратов, производимых биотехнологическим путем в микроорганизмах, являются гормоны. В медицинских целях применяются два основных типа гормонов, различающихся по молекулярному строению: стероидные и пептидные. Среди стероидных гормонов можно выделить кортизон и преднизолон, которые широко используют при лечении различных аллергических заболеваний, в том числе такого тяжелого, как бронхиальная астма, а также ревматоидного артрита и других недугов.

Другой обширной группой стероидов являются половые гормоны, такие как эстроген, широко применяемые для оральной контрацепции и лечения ряда заболеваний. Пептидные гормоны сейчас практически целиком производятся путем синтеза с помощью генетически модифицированных микроорганизмов. Сюда можно отнести уже упоминавшийся инсулин, а также такие антивирусные, антиопухолевые и иммуномодулирующие агенты, как интерфероны и интерлейкины.

Особое место среди лекарственных средств занимают ферменты, которые в широком диапазоне могут синтезировать ГМ-микроорганизмы. Ферменты используются – для лечения самых различных патологий: протеазы и липазы – для коррекции пищеварения; протеазы – для удаления некротических тканей, протеиназы с фибринолитическим действием – для растворения тромбов, а антикоагулянты, например плазмин, эффективны при

лечении инфаркта миокарда и многие другие.

Важный вклад микробной трансгенной биотехнологии в медицину состоит в получении профилактических препаратов, в первую очередь это производство вакцин против различных инфекций. Необходимый антиген можно получить с помощью непатогенного (аттенуированного) микроорганизма, инактивированного генно-инженерными методами, либо экспрессией рекомбинантного антигена и таким образом избежать опасностей, связанных с применением инактивированных вакцин.

К числу важных практических достижений генной инженерии необходимо отнести и получение диагностических препаратов.

Использование биомассы ГМ-микроорганизмов. Согласно прогнозам, к 2050 г. население Земли возрастет до 10 млрд чел. и для обеспечения его потребности в продукции сельского хозяйства нужно будет увеличить объем производства на 75 %. При этом человеку недостает в первую очередь белка животного происхождения, который по аминокислотному составу более богат, чем растительный белок. Промышленная микробиология поставляет животноводству, по крайней мере, три вида важных веществ: кормовой белок и белково-витаминные концентраты (БВК), незаменимые аминокислоты и кормовые антибиотики. Добавление 1 т БВК в корма обеспечивает экономию 7 т фуражного зерна и дополнительное производство 0,8 т свинины или 5 т мяса птицы. Включение 1 т ГМ кормовых дрожжей в рацион телят и поросят позволяет сэкономить 6 т цельного молока. Эти ценные продукты получают путем переработки ГМ-микроорганизмами подсолнечной лузги, кукурузных кочерыжек, соломы и других отходов сельского хозяйства, которые содержат клетчатку.

Второй вид сельскохозяйственной биотехнологической продукции – незаменимые аминокислоты, производство которых для медицины и пищевой промышленности интенсивно развивается во всем мире. Среди них такие, как лизин и метионин, которые обязательно должны содержаться в готовом виде в пище человека и кормах животных. Метионин производят с помощью химической технологии, а лизин – в основном биотехнологически за счет ГМ-микроорганизмов. Добавление лизина в корм скоту резко увеличивает объем мясной продукции: на 1 т лизина высвобождается 40–50 т фуражного зерна и получается дополнительно более 10 т мяса.

Помимо этого, в последнее время в животноводстве и растениеводстве используется около 100 биопрепаратов, таких как стимуляторы роста животных и растений, энтомопатогены и ГМ бактериальные удобрения. Применение таких средств позволяет отказаться от использования или снизить в разы количество применяемых химических средств защиты и минеральных удобрений, что приводит к повышению качества продукции и созданию экологически чистых технологий.

Использование ферментов и добавок в пищевой и кормовой промышленности, произведенных с помощью ГМ-микроорганизмов, означает, что ГМ-микроорганизмы инактивированы, разрушены или удалены из конечного продукта. Генетически модифицированные дрожжи, грибки и

бактерии используют для этих целей уже более десятилетия. В качестве примеров можно привести используемую в хлебопечении альфа-амилазу, применяемую при производстве фруктозы глюкозоамилазу и необходимый для ферментации сыра фермент химозин. Большинство используемых в пищевой промышленности трансгенных микроорганизмов являются производными микроорганизмов, применяемых в традиционной пищевой биотехнологии.

В ряде стран трансгенные микроорганизмы разрешены также для производства микронутриентов, таких как витамины и аминокислоты, используемых в качестве продуктов питания или добавок к рациону. Примером является производство каротиноидов (используемых в качестве пищевых добавок, красителей и добавок к рациону) в ГМ бактериальных системах. В будущем в ГМ-микроорганизмы можно будет интегрировать целые метаболические пути, что позволит синтезировать совершенно новые соединения.

Для нужд животноводства с помощью генной инженерии разработаны такие ветеринарные продукты, как бычий соматотропин, применяемый для повышения эффективности производства молока. В некоторых странах бычий соматотропин впервые появился на рынке более 10 лет назад.

Микроорганизмы в качестве продуктов питания. В настоящее время на рынке нет коммерческих продуктов, содержащих живые генетически модифицированные микроорганизмы. В 1993 г. в Великобритании ГМ-дрожжи получили официальное одобрение для использования в пивоваренной промышленности, однако попытки коммерциализовать продукт не предпринимались. К другим микроорганизмам, используемым для производства продуктов питания (находящимся на стадии исследований и разработки), относятся сбраживающие культуры для хлебопечения и пивоварения и молочно-кислые бактерии, применяемые при производстве сыра. Целью исследований и разработки также является минимизация инфицирования патогенными микроорганизмами и повышение питательной ценности и вкусовых качеств конечного продукта.

Предпринимаются также попытки генетически модифицировать микроорганизмы пищеварительного тракта крупного рогатого скота с целью защиты животных от отравляющих компонентов корма. Современные методы

биотехнологии используют также для создания пробиотиков – микроорганизмов, употребление определенного количества которых с пищей оказывает положительное влияние на здоровье.

Биоремедиация. Известно, что основной вред окружающей среде наносят стоки химических предприятий, содержащие различные синтетические органические соединения, разложение которых в природе происходит крайне медленно. Многие из таких отходов являются ксенобиотиками – токсичными веществами, не включающимися в метаболизм живых организмов. Микробиологи изучают пути катаболизма ксенобиотиков, возможности их разложения и детоксикации. Среди

огромного разнообразия бактерий можно найти отдельные организмы, использующие самые уникальные варианты путей метаболизма, включающие необычные химические соединения. Опираясь на глубокие знания физиологии бактерий, ученые создают ГМ-микрорганизмы с такой комбинацией метаболических путей, что становится возможна переработка или разложение самых необычных, в том числе токсичных, соединений. На основе этих исследований создают биотехнологические способы очистки воды от неприродных соединений, а также методы, позволяющие контролировать загрязнения окружающей среды. В настоящее время ежегодный объем продаж таких препаратов для контроля и мониторинга загрязнений составляет около 10 млн дол., а в ближайшей перспективе эта цифра может достичь 200 млн дол.

Еще одна беда, стоящая перед человечеством, – загрязнение земель и водоемов нефтью и нефтепродуктами. Подобные загрязнения занимают огромные площади вокруг мест добычи нефти, нефтеперерабатывающих предприятий и портов. Нередко причинами экологических бедствий становятся аварии на судах, особенно танкерах, когда нефтью загрязняются акватории и берега рек и морей. Методы генной инженерии активно используются для разработки штаммов-деструкторов, способных быстро разлагать массивные скопления нефтепродуктов.

Клеточные культуры для продукции белков

В последнее время все больше растет потребность общества в разнообразных белковых препаратах. Особенно быстрыми темпами увеличивается применение фармацевтических белковых препаратов в диагностике и терапии заболеваний человека и животных. Это не только антитела и их производные, но многие белки из крови человека (цитокины, ростовые гормоны, интерлейкины, интерфероны и др.). На современном рынке присутствует около ста препаратов на основе белков человека, и это количество растет год от года. Все эти белки произведены *in vitro* при использовании генетически модифицированных клеточных культур, полученных генно-инженерными методами, в основном это бактериальная культура *E. coli*, дрожжевые *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris* или культуры клеток млекопитающих.

Пока наиболее экономически эффективной и хорошо охарактеризованной системой остается бактериальная. Однако благодаря прокариотическому типу данной системы эукариотические белки в ней плохо процессируются и продукция в ней ограничивается простыми структурами (пептиды, небольшие белки), где посттрансляционные модификации отсутствуют или не нужны для биологической функции. Кроме того, высокий уровень синтеза часто приводит к агрегации рекомбинантных белков в виде плохо растворимых телец включения (*inclusion bodies*), что делает необходимым этап ренатурации рекомбинантного белка для перевода в биологически активную форму.

Также необходимым этапом является удаление бактериальных

токсинов, присутствующих в данной системе. При этом общая продуктивность бактериальной системы остается довольно низкой – 0,1–1,5 мг/л.

Дрожжи как эукариотический организм не имеют этих недостатков, но практический опыт показывает, что большое количество синтезируемого продукта теряется вследствие деградации целевого белка в среде. Кроме того, в дрожжах, особенно в *Saccharomyces cerevisiae*, гликопротеины подвергаются гипергликозилированию, в результате которого формируются N-гликаны с очень высоким содержанием маннозы, которые кардинально отличаются от N-гликанов млекопитающих или человека. Ситуация может быть улучшена использованием метилотрофных дрожжей *P. pastoris* в качестве экспрессионной системы. Белковая продукция в дрожжах может достигать 6,4 г/л, но обычно находится в диапазоне 100–200 мг/л. Несмотря на эти ограничения, 43 % рекомбинантных белков, существующих на рынке, продуцируются в бактериях или дрожжах.

Большинство фармацевтических биотехнологических продуктов, однако, продуцируются в различных культурах клеток млекопитающих, например, NSO, BNK, CHO. Как типы, наиболее близкие человеческим клеткам, эти системы дают высокий уровень продукции функциональных рекомбинантных белков с корректным N-гликозилированием и другими посттрансляционными модификациями. Уровень продукции культур клеток млекопитающих приблизительно составляет 1–3 г/л. Этот «золотой стандарт» требует дорогой инфраструктуры и компонентов сред. Кроме того, существует риск вирусной или онкогенной контаминации. Все это приводит к сверхвысокой стоимости конечного продукта, приблизительно варьирующей от 0,3 до 10 тыс. дол. США за грамм в зависимости от количества синтезируемого белка, и к необходимости искать более дешевые альтернативы продукции целевого белка, которым могут стать целые трансгенные растения или животные.

Растительные клеточные культуры. Растения всегда были основным источником биопродуктов для человека, снабжая население пищей, волокнами, древесиной и лекарствами. В области фармацевтики растения используют для получения огромного количества вторичных метаболитов с разнообразными терапевтическими эффектами: ранозаживляющие, антимикробные, противовоспалительные, психоактивные и др. Растения выработали эти субстанции в процессе эволюции, чтобы защитить себя от патогенов и хищников или привлечь опылителей. Современные биотехнологические методы позволяют продуцировать эти продукты предсказуемым образом в клеточных культурах из соответствующих лекарственных растений. Иногда это единственный путь производить препараты в промышленных масштабах, например, когда исходное растение сложно для культивирования или очень редко встречается в природе. В качестве успешных примеров можно привести алкалоиды, паклитаксел (противоопухолевый препарат) и шиконин (антимикробный и противовоспалительный).

Растительные клетки как эукариотическая система обладают всеми чертами для продукции биологически активных сложных белков. Как результат, доля биологически активной формы в синтезированном растительными клетками рекомбинантном тотальном белке бывает очень высока. Так, например, в сравнительном исследовании экспрессии анти-СЕА scFv, клетки табака синтезировали, несомненно, наибольшее количество функционально активного белка (92 %) от тотального рекомбинантного по сравнению с *E. coli* (12 %) и *P. pastoris* (40 %).

Животные клеточные культуры существуют с 50-х гг. прошлого века, когда были выделены в клеточную культуру HeLa клетки и СНО клеточная линия. Больше пятидесяти лет развития позволило производству на основе животных клеточных культур достигнуть выдающихся успехов. По данным за 2007 г. приблизительно шестая часть наиболее популярных лекарств являются биотехнологическими продуктами. Девять из десяти наиболее популярных биотехнологических лекарственных препаратов, продающихся в США, произведены в клеточной культуре клеток млекопитающих и, по крайней мере, продажи 23 белковых препаратов превышают один миллиард долларов.

Трансгенные растения и животные как биореакторы

Задачей селекционеров во все времена было получение хозяйственно ценных растений, животных, микроорганизмов. Основными методами традиционной селекции являются отбор, гибридизация, мутагенез, полиплоидия с целью получения нужного признака, который кодируется новым геном или новым комплексом генов. Существенное продвижение в понимании того, как функционируют гены, расшифровка геномов и развитие методологии геномной инженерии позволили перейти от длительных и трудоемких методов традиционной селекции к прямому генетическому конструированию нужных признаков у конкретного организма. При создании трансгенного организма новый генный комплекс конструируется в пробирке и напрямую вводится в организм, фактически таким методом получения нового признака ученые просто ускоряют эволюцию.

Новые методы селекции – это сочетание молекулярных и традиционных методов. Необходимо отметить, что старые методы также остаются широко востребованными при создании новых организмов. Выяснилось, что трансформированные с идентичной конструкцией ДНК трансгенные клоны, полученные параллельно в одном и том же опыте, значительно различаются по уровню экспрессии введенного гена, поскольку работает эффект положения и копияности гена. И необходимо проводить дальнейший отбор с анализом наследования полученного признака, используя традиционные методы селекции. Генно-инженерные манипуляции с геномом, сформировавшимся в процессе длительной эволюции, могут нарушать, в какой-то степени, сбалансированные генные комплексы и, соответственно, жизнеспособность полученных трансгенных организмов. Например, встраивание селективного гена, нужного только для отбора

трансгенных растений, может нарушить первичную структуру какого-либо хозяйского гена и тем самым вызвать его инактивацию. Это событие, по-видимому, не так редко, особенно с учетом того, что трансгены чаще встраиваются в транскрибируемые области хроматина (эуроматин). В последующих поколениях такой инактивированный ген может перейти в гомозиготное состояние, выражаясь в непредусмотренной и обычно нежелательной фенотипической мутации. Появляется необходимость дальнейшего скрещивания и отбора для удаления нежелательных побочных мутаций у трансгенов. Иногда имеется необходимость удаления маркерных генов вообще, так что для получения новых организмов применяется сочетание старых и новых методов селекции.

В настоящее время практическая генно-инженерная биотехнология развивается по двум основным направлениям. Первое направление, получившее не очень удачное название «молекулярное разведение (или селекция)» (molecular breeding), специализируется на решении новыми методами традиционных селекционно-генетических проблем повышения продуктивности хозяйственно ценных организмов и их защиты от различных биотических и абиотических стрессовых факторов. Второе направление, названное «молекулярным производством» (molecular farming), специализируется на получении и использовании трансгенных организмов в качестве биореакторов, продуцирующих ценные для промышленности и медицины органические соединения.

Коммерциализация трансгенных растений и биобезопасность

С момента публикации в 1983 г. первых работ по получению трансгенных растений табака прошло не очень много времени, но существующее сейчас количество самых разнообразных трансгенных растений уже не поддается учету. И, несмотря на то, что путь от лабораторного получения трансгенного растения до его коммерческого применения довольно долг, в настоящее время в сельскохозяйственном производстве общие площади биотехнологических культур достигли уже 114,3 млн га (рис. 31). Разрешения на коммерческое использование дожидаются сотни сортов десятков видов пищевых растений и технических растений с самыми разнообразными новыми свойствами. Новые культуры проходят длительную всестороннюю тщательную проверку в отношении биобезопасности.

Самыми распространенными из трансгенных сельскохозяйственных растений является соя (51 %), за ней следуют быстро набирающая объемы культивирования кукуруза (31 %), хлопок (13 %) и рапс (5 %). Необходимо отметить, что некоторые генно-модифицированные культуры (например, ГМ-соя) уже обогнали по захваченной площади свои «традиционные» аналоги.

ОБЩАЯ ПЛОЩАДЬ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ КУЛЬТУР В МИРЕ (1996 -2007 гг)



Рисунок 31. - Рост общих площадей под посевами биотехнологических культур в 1996–2007 гг. (по данным ISAAA). В 2007 г. по сравнению с 2006 г. произошло увеличение площадей на 12 % или 12,3 млн га

По рейтингу свойств коммерциализированных трансгенных растений, составленному Международной службой по использованию агробиотехнологии (ISAAA), на протяжении всего периода культивирования с 1996 по 2007 гг. первое место занимают гербицидоустойчивые культуры, затем следуют Bt-культуры, устойчивые к насекомым-вредителям, за ними – комбинированные культуры, в последние годы появились культуры, совмещающие три признака. В 2007 г. все устойчивые к гербицидам культуры (соя, кукуруза, рапс, хлопок, люцерна и др.) суммарно занимали 63 %; Bt-культуры – 18 %; комбинированные культуры с двумя или тремя признаками – 19 %. В 2007 г. по сравнению с 2006 г. быстрее всего увеличивались площади посевов комбинированных культур (с двумя и тремя признаками) – на 66 %; затем и другие Bt-культуры – 7 % роста и устойчивые к гербицидам культуры – 3 % роста.

Начинает увеличиваться доля культивируемых трансгенных растений, устойчивых к вирусам, грибкам, нематодам и другим вредителям, холоду, жаре, засухе или долго не портящихся при хранении. Новые сорта способны не только расти, но и приносить хороший урожай там, где старые сорта просто не могли выжить (слишком холодно или тепло, или сухо). Например,

Северная Дакота, ранее считавшаяся совершенно не пригодной для выращивания соевых бобов, в настоящее время уже стала одним из главных поставщиков этой культуры в США.

Численность населения планеты составляет 6,6 млрд (на 2008 г.), в год увеличиваясь примерно на 80 млн. По прогнозам ООН, к 2020 г. население Земли возрастет с нынешних 6,6 до 7,5 млрд чел., а к 2050 г. превысит 9

млрд чел. Уже сейчас продовольствия не хватает (около 800 млн чел. в мире голодают), а в дальнейшем эта проблема только обострится, так как увеличение производства продуктов питания стало отставать от прироста населения. Все возможные территории для землепользования уже освоены, традиционные способы повышения продуктивности сельскохозяйственного производства себя уже исчерпали, а дефицит продуктов питания продолжает нарастать. Так что альтернативы применению генно-инженерных сельскохозяйственных культур не видно.

Генетически модифицированные продукты стали одним из достижений биологии XX в. Рост потребления таких продуктов считается одним из способов борьбы с голодом. Ныне во многих странах мира практически невозможно избежать употребления генетически модифицированных растений.

Так, с большой долей вероятности можно сказать, что практически все продукты, произведенные с использованием кукурузного, соевого или хлопкового масла, содержат генетически измененный материал.

Перспективы использования генетически модифицированных организмов

В течение последних 50 лет достижения генетической и молекулярной биологии обеспечили возможность создания и коммерческого использования генетически модифицированных организмов, обладающих новыми свойствами за счет преодоления межвидовых барьеров. Присущие ГМО характеристики могут оказать значительное положительное влияние на производство продуктов питания, фармакологических препаратов, ценного сырья для промышленности. Наиболее коммерциализованными из ГМО являются растения, поскольку для них процесс трансгеноза осуществляется гораздо легче и быстрее. Это обусловлено способностью растений регенерировать из единственной клетки и возможностью вегетативного размножения. В настоящее время ГМ-культуры занимают около 4 % общей площади возделываемых земель в мире. Среди культивируемых ГМ-растений первое место занимает соя, за которой следуют кукуруза и хлопок. В стадии получения разрешения на культивирование находятся сотни видов растений с измененной пищевой ценностью, повышенной продуктивностью, устойчивостью к внешней среде, с измененным внешним видом и т.д.

С ГМ-растениями связаны надежды на преодоление дефицита продовольствия и сырья, несмотря на растущее население нашей планеты. Традиционные способы повышения продуктивности сельскохозяйственного производства себя уже исчерпали, а дефицит продуктов питания продолжает нарастать. Единственной альтернативой остается совершить качественный скачок в производстве продуктов питания путем конструирования новых видов растений с резко увеличенной хозяйственной полезностью и устойчивостью к неблагоприятным факторам культивирования.

В отличие от растений, получение трансгенных животных – очень сложный и длительный процесс, чрезвычайно тесным образом связанный с

достижениями в области молекулярных и репродуктивных технологий. В настоящее время подавляющее большинство проектов по созданию трансгенных животных находится на ранних этапах исследований и разработки, за некоторыми исключениями. Необходимость создания таких животных диктуется, в первую очередь, насущными потребностями человека в фармацевтических препаратах из человеческих белков.

Основной платформой для производства таких белков являются клеточные культуры животных и человека. Девять из десяти наиболее популярных биотехнологических лекарственных препаратов, продающихся в США, произведены в клеточной культуре клеток млекопитающих и, по крайней мере, продажи 23 белковых препаратов превышают один миллиард долларов.

Появляются новые препараты, которые нужно производить в больших количествах, чтобы удовлетворить растущие потребности общества. Ожидается, что рекомбинантные антитела станут наиболее важным и успешным продуктом, особенно для применения в онкологии. Однако количество этого препарата для удовлетворения потребностей мирового рынка просто огромно – от сотни килограммов до нескольких тонн, что превышает текущие и, вероятно, будущие возможности производства на основе клеточных культур. Установлено, что при промышленной продукции моноклональных антител в количестве ~100 кг/год стоимость грамма рекомбинантного препарата при использовании трансгенной козы будет в 3-4 раза меньше, чем в культуре СНО-клеток с дальнейшей экономией при увеличении масштабов производства.

Для биоактивности многих человеческих белков требуется соответствующий посттрансляционный процессинг, и это главная причина использования для биопродукции животных или культивируемых животных клеток, а не бактерий, дрожжей или растений. Это относится ко многим важным биомедицинским продуктам, таким как факторы свертывания крови и антитела, которые в настоящее время не имеют другой альтернативы, чем продукция в животных клетках. Таким образом, создание трансгенных животных может решить многие проблемы современного общества.

Подтверждением необходимости трансгенных организмов является бурный рост биотехнологических рынков в последние годы. Так, например, продажи на рынке биотехнологических медицинских препаратов в 2007 г. достигли более 75 млрд дол., с общим ростом в 12,5 %, что в два раза больше, чем рост глобального фармацевтического рынка, согласно докладу IMS Health, из них 56% продаж пришлось на США. В 2006 г. рынок биотехнологических медицинских препаратов вырос на 18,2 % до приблизительно 65 млрд дол. (миллиардов). Причем основная прибыль в 2007 г. была получена большей частью за счет продаж 22 биотехнологических продуктов, приблизительно по 1 млрд дол. за каждый. Для сравнения, в 2002 г. таких «блокбастеров» было только шесть. Десятку самых популярных терапевтических агентов возглавляют эритропоэтины, далее следуют противоопухолевые, антидиабетические препараты, аутоиммунные агенты и

интерфероны, согласно IMS Health. В будущем ожидается большое количество противоопухолевых препаратов в сочетании со значительной неудовлетворенной потребностью в них.

3. ДОСТИЖЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ В ГЕНОТЕРАПИИ

Геном человека

Существует точка зрения, которую разделяет немалое число специалистов, что все заболевания человека за исключением травм связаны с генетическими дефектами. Очевидно, это крайняя точка зрения, тем не менее она отражает важность генетических факторов в определении состоянии здоровья людей. Генетические дефекты бывают разной значимости и состояния.

Хотя обычно считают диабет и мышечную дистрофию заболеваниями, а расщепление неба или цветовую слепоту – наследственными дефектами – все это является результатом мутаций в генетическом материале. Показано также, что предрасположенность к заболеванию также зависит от генетической конституции.

Генетические дефекты или мутации в последовательности ДНК выражаются в замене одного нуклеотида другим, потере целого фрагмента или его переносе на другое положение в геноме и пр. Такие изменения могут привести к изменениям структуры (и функции) белка, который кодируется данным фрагментом ДНК или к изменению регуляторных участков генов, губительным для клеток. Говоря о наследственных заболеваниях, мы имеем в виду мутации, которые появляются в половых клетках и передаются потомству. В соматических клетках на протяжении жизни также накапливаются мутации, которые могут стать причиной заболевания, но они по наследству не передаются. Ранее считалось, что все мутации вредны. Это связано с тем, что именно с таких мутаций, вызывающих заболевания, было начато изучение генетических характеристик человека. Но сейчас, когда прочитан практически весь нуклеотидный текст человека, стало ясно, что большая часть мутаций является нейтральной. Вредные мутации, приводящие к грубому нарушению развития организма, отсеиваются отбором – их носители не выживают или не дают потомства.

Огромный прорыв в понимании, как унаследованные гены влияют на физические и психологические особенности человека, произошел за последние десятилетия благодаря открытиям, сделанным при исследовании генома человека. Установлены и диагностируются как целый ряд генетических заболеваний, так и предрасположенность к ним, причем на самых ранних этапах развития эмбриона. Большие надежды на расширение возможностей современной медицины связаны с реализацией проекта «Геном человека».

Практическое значение результатов секвенирования генома человека

С результатами секвенирования генома человека связаны надежды на возможность лечения генетических заболеваний. К настоящему времени в мире идентифицировано множество генов, ответственных за болезни человека, в том числе болезнь Альцгеймера, болезнь Гоше, атаксию, муковисцидоз, мышечную дистрофию Дюшенна, дистонию, гемофилию А и В, фенилкетонурию, серповидно-клеточную анемию, талассемию, синдром хрупкости X-хромосомы, наследуемый рак молочных желез и яичников и др. Структуры этих генов расшифрованы, и сами они клонированы. Это позволяет проводить эффективную раннюю и даже пренатальную диагностику и лечение.

Тестирование будущих родителей на высокий риск генетического заболевания теперь может осуществляться для постоянно растущего числа генов. При этом типичным подходом является использование исследований при помощи гибридизации или ПЦР-анализа. Можно протестировать здорового человека из семьи, где встречался, например, кистозный фиброз, и определить, есть ли у него копия дефектного гена или нет. Если неблагоприятного сочетания генов избежать не удалось и оба потенциальных родителя являются носителями рецессивного дефекта, они должны сами решать, рисковать ли им, чтобы иметь детей. В любом случае раннее начало профилактического лечения ребенка позволит предотвратить начало заболевания или отодвинуть начало его проявления.

В настоящее время в практику медико-генетического консультирования введены десятки систем для генодиагностики наиболее распространенных наследственных заболеваний. Установленная последовательность генома поможет идентифицировать новые гены и выявить среди них те, что обуславливают предрасположенность к тем или иным заболеваниям.

Как было отмечено ранее, в ходе выполнения проекта «Геном человека» были установлены последовательности целого ряда организмов – бактерий, среди которых немало патогенных, дрожжей, круглого червя *Caenorhabditis elegans* (нематоды), дрозофилы, мухи, москита, мыши, крысы, собаки, шимпанзе, рыбы-собаки и растений – арабидопсиса, тополя и двух видов риса.

Полученная информация (большую часть которой еще предстоит осмыслить) открыла новые возможности для развития сравнительной геномики. Оказалось, к примеру, что из 269 генов человека, мутации которых приводят к болезням, 177 генов имели родственные гены в геноме дрозофилы. Сравнение мышиногенома с человеческим показало, что около 200 геномных блоков у человека и мыши содержат одинаковые гены (хотя и в разных хромосомах).

Количество генов у нематоды только в 4-5 раз меньше, чем у человека, и часть из них также являются общими. Это позволяет изучать функции новых генов человека и последствия мутаций известных генов, прослеживая

изменение свойств организма в опытах с экспериментальными животными и экстраполируя полученные результаты на человека.

В процессе прочтения генома был выявлен еще один механизм генетического разнообразия, так называемый однонуклеотидный полиморфизм (фактор СМП, по английской транскрипции). СМП – это изменение «буквы» генетического кода без «последствий для здоровья». Считается, что у человека СМП встречается с частотой 0,1 %, т.е. каждый человек отличается от других одним нуклеотидом на каждую тысячу нуклеотидов. У шимпанзе, представляющей собой более древний вид и к тому же гораздо более гетерогенный, число СМП при сравнении двух разных особей достигает 0,4 %. Но если различия в СМП не сказываются на здоровье особей, то чем они интересны и важны? Оказалось, что практическое значение СМП велико. Известно, что самые распространенные лекарства эффективны не более чем для четверти нуждающегося населения. Минимальные генетические отличия, обусловленные СМП, определяют эффективность лекарств и их переносимость в каждом конкретном случае.

Например, в одном из генов, кодирующих синтез рецептора адреналина, выявлено 13 СМП, которые могут комбинироваться друг с другом, давая 8 192 различных варианта (гаплотипа). Среди астматиков довольно популярно лекарство албутерол, которое взаимодействует с указанным рецептором адреналина и подавляет приступ удушья. Однако из-за разнообразия гаплотипов людей лекарство действует не на всех, а некоторым больным оно вообще противопоказано. Это обусловлено СМП: люди с последовательностью букв в одном из генов ТЦТЦЦ (Т – тимин, Ц – цитозин) не реагируют на албутерол, если же концевой цитозин заменен на гуанин (ТЦТЦГ), то реакция есть, но частичная. Для людей же с тимином вместо концевого цитозина в этом участке – ТЦТЦТ – лекарство токсично!

Необходимо отметить, что развитие и достижения геномики человека, в свою очередь, обеспечили новые возможности для развития целого ряда других научных направлений (рис. 32).

количеств мишени и достаточно простым и надежным, позволяющим получать однозначные результаты в условиях обычной медицинской лаборатории.

Различают два основных метода молекулярной диагностики – иммунодиагностика, основанная на сродстве антитела к антигену, и ДНК-диагностика, основанная на гибридизации нуклеиновых кислот (спаривании комплементарных фрагментов ДНК) и ПЦР.

Методы иммунодиагностики – основные закономерности и разнообразие

В основе любого иммунодиагностического исследования лежит высоко специфичное и эффективное взаимодействие антиген – антитело (рис. 33).

Таким образом, связывание антитела с антигеном-мишенью (появление в образце комплексов АТ~АГ) свидетельствует о наличии анализируемого антигена (инфекционного агента или целевого биологически активного соединения).

Задача состоит в том, чтобы о своем наличии такие комплексы «сообщали» каким-либо визуальным сигналом, т.е. необходимо каким-то образом «пометить» антитело. Долгое время в качестве меток в иммуноанализе использовали радиоактивные изотопы. Они обеспечивали высокую чувствительность анализа, однако обладали рядом недостатков: нестабильностью (использовали высокоактивные короткоживущие изотопы), невозможностью автоматизации анализа, опасностью для персонала лабораторий и производства. Альтернативой радиоиммуноанализу стал так называемый иммуноферментный анализ, общую схему которого можно представить следующим уравнением:



где Е – это фермент;

АТ~Е – антитело, меченное ферментом (химически синтезированный комплекс);

S – субстрат данного фермента;

P – продукт ферментативной реакции, обладающий каким-либо визуальным признаком (окраской, флуоресценцией или люминесценцией).

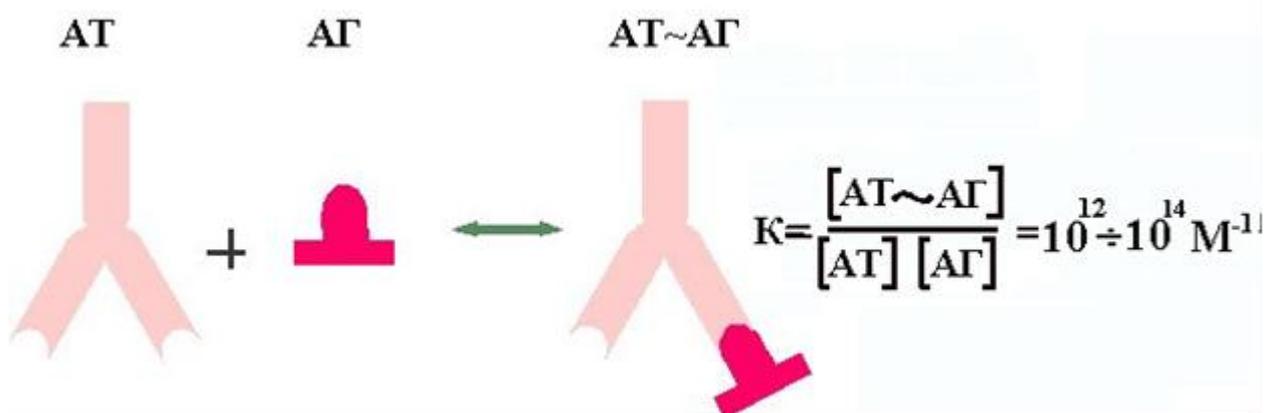


Рисунок 33. - Взаимодействие антиген – антитело

По интенсивности полученного от продукта сигнала судят о наличии и количестве молекулы-мишени. Широко распространенной разновидностью иммуноферментного анализа является так называемый ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA, по английской транскрипции названия метода).

Схема такого анализа приведена на рис. 34.

Поскольку иммуноферментный метод получил весьма широкое распространение, поиск ферментов, как можно более полно удовлетворяющих всем требованиям, продолжается и в настоящее время. Весьма перспективными оказались биолюминесцентные ферменты – люциферазы – белки, одним из продуктов реакций которых является квант света в видимой области спектра. Все люциферазы считаются оксигеназами, т.е. катализируют реакции окисления субстрата молекулярным кислородом.

Перспективность аналитического использования люцифераз обусловлена высоким квантовым выходом биолюминесцентной реакции. Например, для люциферазы, выделенной из светляков, он составляет около 90 %. В настоящее время известно огромное количество различных биолюминесцентных животных, в основном морских, изучены их биолюминесцентные системы, клонированы гены люцифераз, установлены структуры и синтезированы молекулы субстратов. Особое место среди биолюминесцентных белков занимают Ca^{2+} -активируемые фотопротеины морских кишечнорастных. Молекула фотопротеина представляет собой стабильный фермент-субстратный комплекс, состоящий из односубъединичного полипептида (молекулярная масса около 20 кДа) и «преактивированного» кислородом субстрата, 2-гидропероксицелентеразина, прочно, но нековалентно связанного с белком.

Биолюминесценция инициируется ионами кальция и возникает вследствие окислительного декарбоксилирования связанного с белком субстрата.

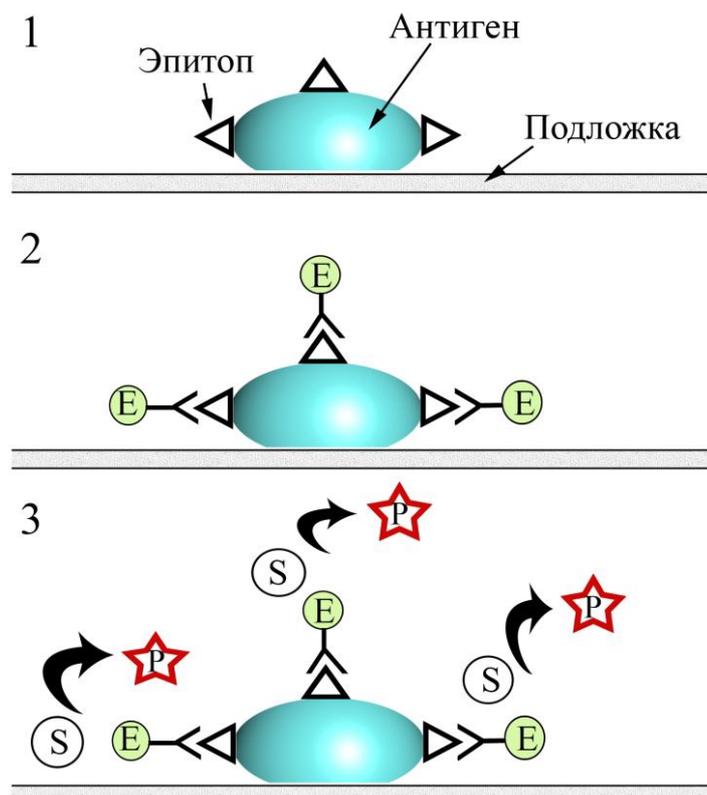


Рисунок 34. - Схема проведения ELISA: E – репортер-ный фермент; S, P – субстрат и визуально определяемый продукт фермента соответственно

Методы диагностики, основанные на ДНК-гибридации

Иммуноанализ имеет свои ограничения: в случае диагностирования инфекционного заболевания с помощью него невозможно различить антитела индуцированные в результате прививки и в ответ на инфицирование; если речь идет об особо опасных инфекциях, когда антитела не успевают образоваться или не образуются вовсе; если поражается иммунная система (СПИД); иногда он не в состоянии обеспечить необходимую чувствительность и т.д.

Незаменимыми и весьма эффективными в таких случаях являются методы, основанные на детекции определенных нуклеотидных последовательностей, – ДНК-гибридизационный анализ. Инфекционные агенты (бактерии, вирусы и пр.) представляют собой живые организмы, их информация заключена в генетическом материале. Фрагмент ДНК, детерминирующий данный биологический объект, имеет строго определенную нуклеотидную последовательность и может служить диагностическим маркером. Процедура любого гибридизационного анализа состоит в следующем:

1) иммобилизация одноцепочечной ДНК-мишени на твердой подложке (мембранный фильтр, поверхность планшета и т.п.);

2) спаривание меченой комплементарной последовательности (ДНК-зондом) с ДНК-мишенью при определенных условиях (температуре и ионной силе);

- 3) удаление несвязавшегося ДНК-зонда;
- 4) детекция гибридных молекул зонд-мишень.

Таким образом, в процедуре ключевыми являются три компонента: ДНК-зонд, ДНК-мишень и метод детекции полученных гибридов (рис. 35).

Специфичность анализа определяется ДНК-зондами, а чувствительность – методами детекции. В зависимости от ситуации используют зонды различной длины (20–100 нуклеотидов). Они представляют собой продукты химического синтеза или клонирования.

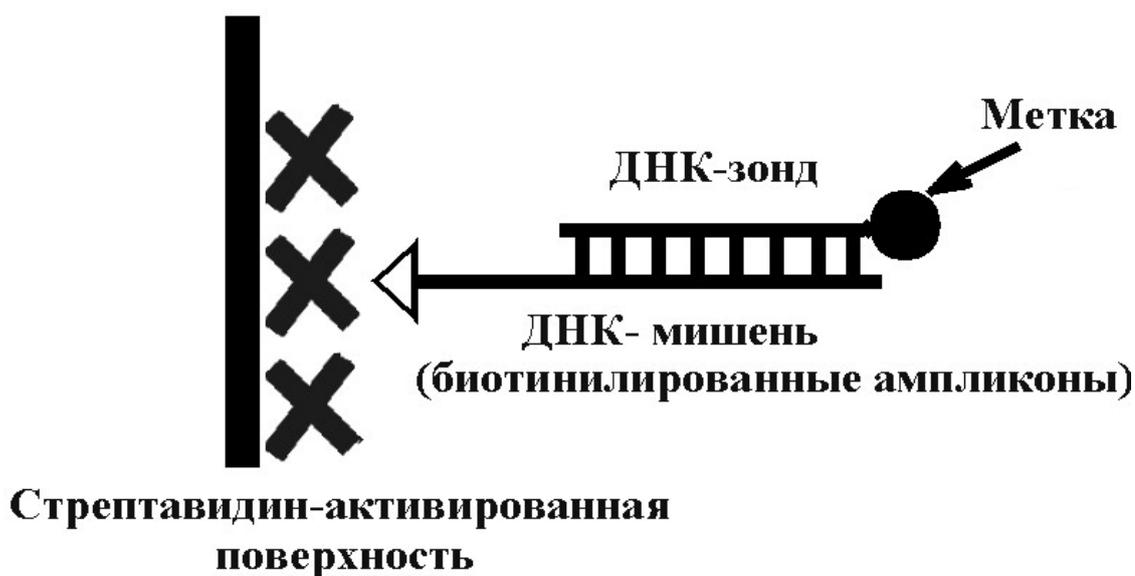


Рисунок 35. - Один из вариантов проведения ДНК-гибризационного анализа. В качестве метки используют изотопы, специфические гаптены, последовательности ДНК, белки

Для получения зондов клонированием проводят следующие процедуры:

- 1) расщепляют ДНК патогенного микроорганизма эндонуклеазой и клонируют в плазмидном векторе;
- 2) проводят скрининг рекомбинантных плазмид с использованием геномной ДНК как патогенного, так и непатогенного штаммов;
- 3) плазмиды, гибридизующиеся только с ДНК патогенного штамма, используют для получения видоспецифичных зондов. Эти зонды дополнительно проверяют на отсутствие перекрестной гибридизации с ДНК из различных организмов и на модельных образцах для определения чувствительности метода.

Химический синтез олигонуклеотидов еще 20 лет назад представлял собой сложную экспериментальную задачу, связанную с большими затратами времени и реактивов, поэтому олигонуклеотиды были достаточно дороги.

В настоящее время получение олигонуклеотидов осуществляется с помощью автоматических синтезаторов, и исследователь должен только

правильно определить, какая именно нуклеотидная последовательность необходима для решения поставленной задачи.

Во всех синтезаторах синтез осуществляется твердофазным методом, т.е. первый нуклеозид иммобилизован на поверхности нерастворимых полимерных частиц, а растущая цепочка экспонирована к реакционной смеси, в которой находятся все необходимые реагенты. Частицы упакованы в колоночных реакторах, через которые последовательно прокачиваются растворы веществ, обеспечивающих протекание процессов синтеза. С целью создания оптимальных гидродинамических параметров колонки частицы имеют сферическую форму и одинаковые размеры. Ключевыми мономерами для синтеза являются четыре производных нуклеозид-фосфорамидита (рис. 36), в которых все функциональные группы заблокированы защитными группами. 5'-гидроксильная группа каждого мономера защищена диметокситритильной группировкой (DMTr), которая легко удаляется при кислотной обработке, например, трихлоруксусной кислотой (ТХУ). По 3'-положению находится метилированная фосфитамидная группа.

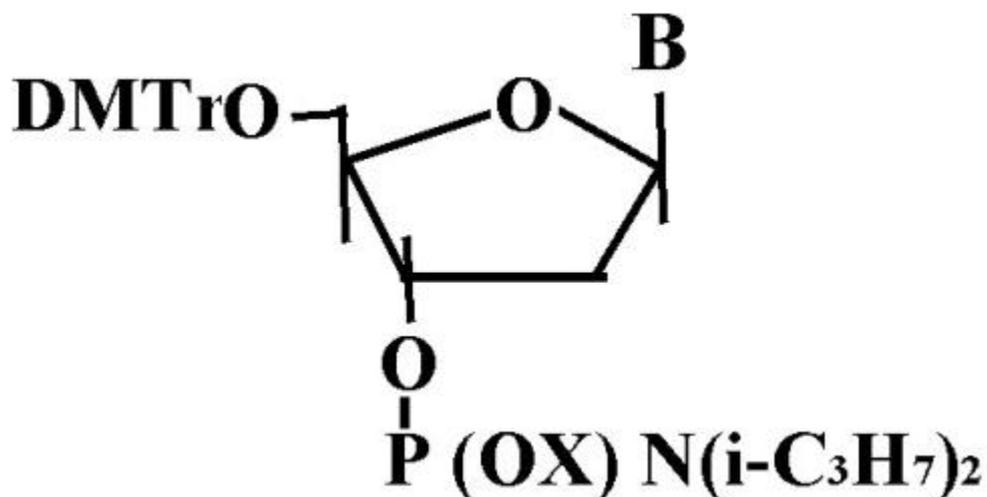


Рисунок 36. - Мономеры для твердофазного фосфитамидного синтеза олигонуклеотидов (синтоны)

Экзоциклические аминогруппы, находящиеся в составе гетероциклических оснований В (гуанина, аденина и цитидина) заблокированы группировками (ацильные остатки), которые удаляются в щелочных условиях по окончании синтеза. Такие мономеры называются синтонами.

Схема химического синтеза олигонуклеотидов приведена на рис. 37.

Рассмотрим несколько примеров проведения гибридизационного анализа (рис. 38). На неподвижной матрице в качестве зонда иммобилизовали 20-звенный олигонуклеотид З1, комплементарный участку ДНК вируса гепатита С. В качестве неподвижной фазы использовали поверхности планшетов или полимерных частиц. Иммобилизацию проводили с помощью ковалентной пришивки.

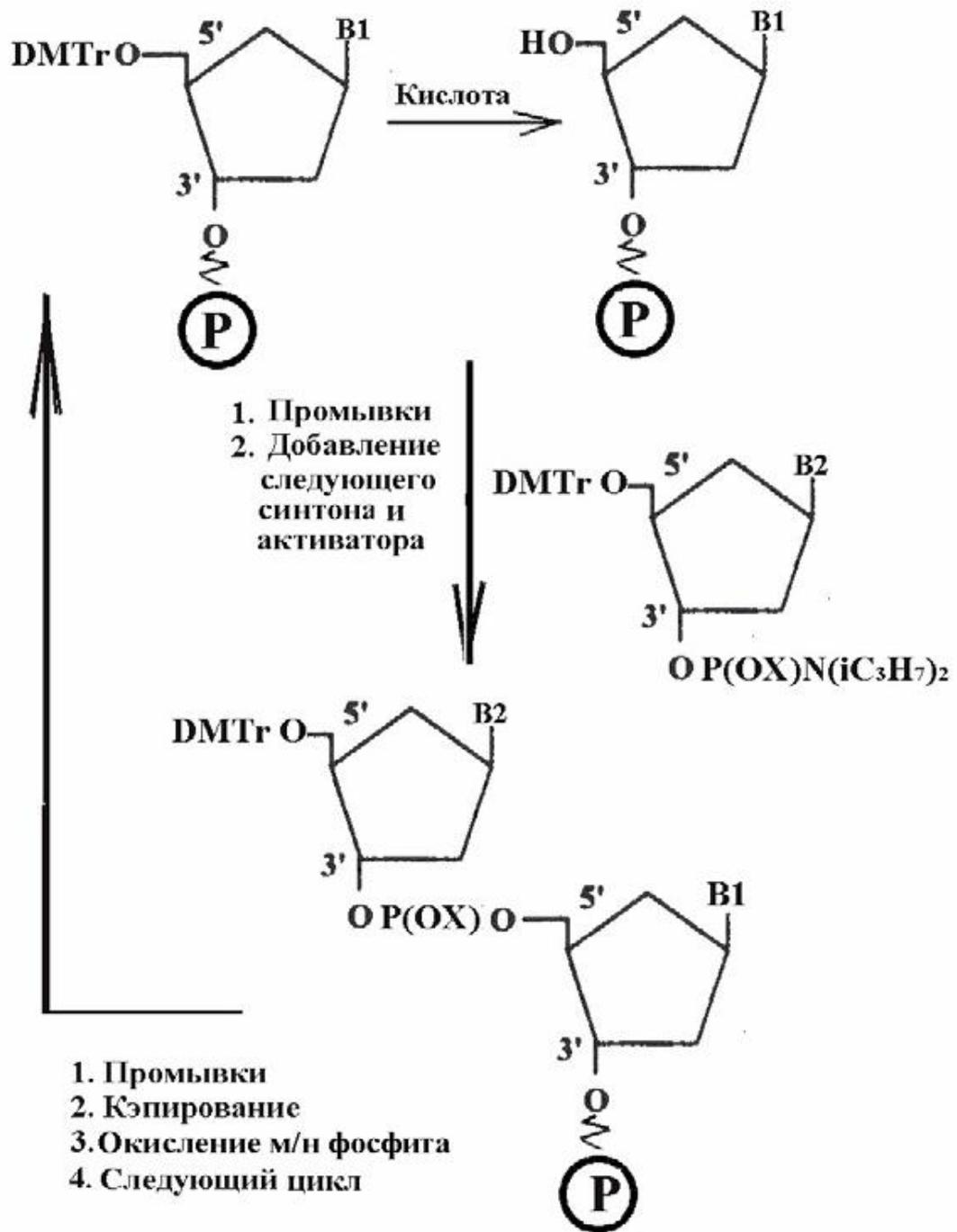


Рисунок 37. - Схема химического синтеза олигонуклеотидов: P – нерастворимый полимер или стекло – частицы, на поверхности которых фиксированы первые нуклеотиды и растущая олигонуклеотидная цепь; B1, B2... – нуклеотидные основания; DMTr – диметок-ситритил

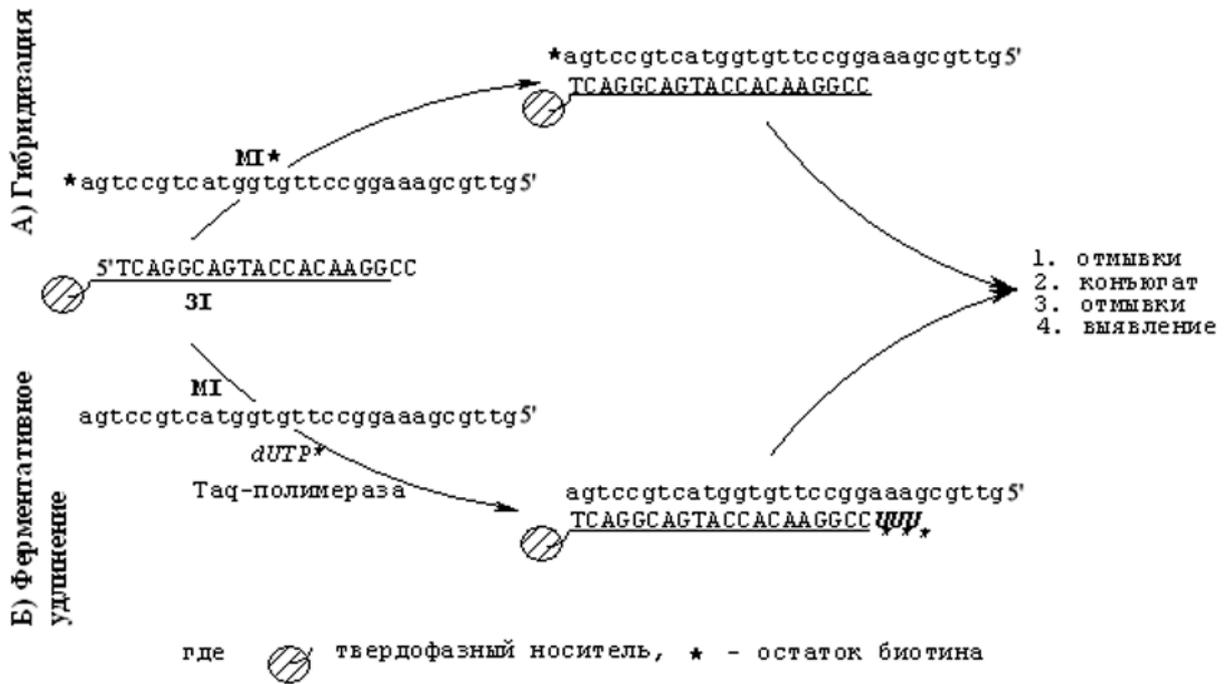


Рисунок 38. - Схема проведения твердофазного ДНК-гибридизационного анализа

Для выявления гибридов использовали конъюгаты репортерного белка с авидином или стрептавидином

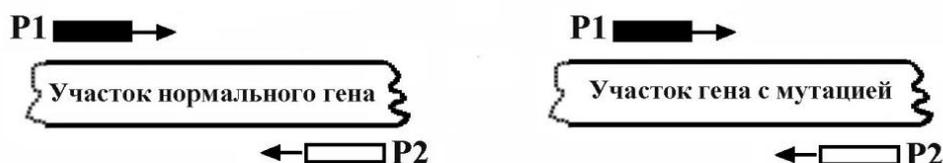
В качестве ДНК-матрицы использовали синтетический 30-звенный олигонуклеотид MI*, несущий на 3'-конце остаток биотина (рис. 38, вариант А). После гибридизации и удаления непрореагировавших молекул (с помощью промывок) обнаружение образовавшихся комплексов проводили с помощью конъюгатов – стрептавидин-щелочная фосфатаза или стрептавидин-обелин. Известно, что стрептавидин из стрептококка или его аналог авидин из белка куриных яиц обладают чрезвычайно высоким сродством к биотину ($K_d = 10\text{--}15\text{ M}$). Эти белки состоят из 4 одинаковых субъединиц, каждая из которых имеет сайт связывания с биотином.

Помимо обнаружения инфекционных агентов, ДНК-диагностика применяется для выявления генов наследственных заболеваний. ДНК-анализ используют для выявления носителей генов заболеваний, а также для пренатальной и пресимптоматической диагностики генетических нарушений. Ранее для определения специфических мутаций использовали биохимические методы, основанные на выявлении продукта анализируемого гена. ДНК-тесты устанавливают мутации непосредственно в последовательности гена без экспрессии и изучения кодируемого белка. В настоящее время разработан целый ряд различных методов скрининга гензаболеваний. Ранее был рассмотрен метод, основанный на выявлении измененных сайтов рестрикции (полиморфизм длины рестриционных фрагментов). Такие мутации приводят к образованию набора рестриционных фрагментов ДНК, который отличается от набора фрагментов нормальной ДНК. Этот подход успешно используется для

диагностики тяжелейшего наследственного заболевания – серповидноклеточной анемии.

Серповидноклеточная анемия – заболевание, обусловленное заменой одного нуклеотида в кодоне, соответствующем шестой аминокислоте в β -цепи молекулы гемоглобина. В результате вместо валина на этом месте находится глутаминовая кислота, что приводит к искажению конформации гемоглобина и, как следствие, неэффективному переносу кислорода, осуществляемому этим белком. Индивиды, гомозиготные по мутантному гену (S/S), имеют эритроциты серповидной формы и страдают тяжелой анемией, приводящей к поражениям сердца, легких, мозга и других органов. Индивиды, гетерозиготные по данному гену (A/S), являются носителями данного заболевания и страдают от него только в экстремальных условиях при снижении снабжения организма кислородом. Оба гетерозиготных родителя с вероятностью 25 % произведут на свет дитя, гомозиготное по этому признаку, т.е. больного серповидноклеточной анемией. Один из используемых тестов основан на рестрикционном анализе β -глобинового гена (рис. 39).

1. Амплификация с одинаковыми праймерами



2. Гидролиз ампликонов нуклеазой *CnvI*



3. Электрофоретическое разделение продуктов рестрикции



Рисунок 39. - Выявление мутантного гена, ответственного за развитие серповидноклеточной анемии: P1, P2 – праймеры для амплификации; AA – гомозиготность по нормальному β -глобиновому гену; AS – гетерозиготность; SS – гомозиготность по гену анемии

В нормальном гене интересующий нас участок имеет

последовательность CCTGAGG, в мутированном – CCTGTGG . В первом случае последовательность представляет собой сайт для рестрицирующей эндонуклеазы Cvn1, а во втором – этот сайт отсутствует. Тестируемую ДНК амплифицируют с помощью ПЦР с использованием праймеров, фланкирующих сайт Cvn1.

Амплифицированный фрагмент обрабатывают Cvn1 и разделяют продукты рестрикции с помощью гель-электрофореза. При этом получают различный набор полос: нормальный ген содержит 3 сайта рестрикции и гомозиготный образец (A/A) демонстрирует 4 фрагмента на электрофореграмме. Мутантный ген содержит 2 сайта рестрикции, и гомозиготный образец (S/S) имеет 3 рестрикционных фрагмента, один из которых обладает большой молекулярной массой. Гетерозиготный образец имеет суммарный набор фрагментов того и другого гена. Таким образом, генетический статус обследуемого устанавливают довольно быстро без гибридизационного анализа продуктов амплификации.

Если однонуклеотидные замены не приводят к изменению сайтов рестрикции известных рестриктаз, их можно устанавливать с помощью других методов. Один из них сочетает ПЦР и метод лигирования («сшивки») олигонуклеотидных зондов (ЛОЗ), ПЦР/ЛОЗ. Схема проведения такого анализа показана на рис. 40. Рассмотрим случай, когда в определенном положении произошла замена T→G. Вначале синтезируют короткие олигонуклеотиды, комплементарные участкам, прилегающим к данному сайту справа и слева и помеченные разными гаптенами: зонд X помечен биотином, а Y – дигоксигенином (дигоксигенин – стероид, выделенный из наперстянки)). Обе ДНК амплифицируют и проводят отжиг с обоими зондами. Нормальная ДНК-мишень гибридизуется с обоими зондами полностью и при добавлении ДНК-лигазы ковалентно сшиваются. В мутантной ДНК зонд X не образует пару с концевым нуклеотидом и ДНК-лигаза не может сшить эти два фрагмента.

На следующей стадии проводят денатурацию ДНК и переносят полученные смеси в пластиковую лунку, на поверхности которой иммобилизован стрептавидин. Биотинилированные молекулы ДНК связываются со стрептавидином, а весь несвязавшийся материал удаляют промывкой. Затем в лунку вносят антитела к дигоксигенину, помеченные каким-либо ферментом, например пероксидазой. При внесении хромогенного субстрата в лунках с нормальной ДНК, где произошло лигирование, произойдет окрашивание субстрата. (Узнаете вариант ELISA?) Если окрашивания не наблюдается, значит, лигирования не произошло и мы имеем мутированную ДНК. Используя две пары зондов, комплементарных нормальному и мутированному сайту, можно определить генетический статус индивида – является ли он гомо- или гетерозиготным носителем данной мутации.

ПЦР/ЛОЗ является быстрым, чувствительным и высокоспецифичным методом, осуществляемым в автоматизированном режиме. Более простой вариант этого метода – это метод лигазной цепной реакции. Для реакции

используют большие избытки обоих индикаторных зондов X и Y и термостабильную ДНК-лигазу. Лигирование проводят при 65 °С, затем денатурируют образовавшиеся гибриды при 95 °С и вновь понижают температуру до 65 °С для гибридизации свободных нелигированных зондов с ДНК-мишенью. Цикл повторяют 20 раз. Если комплементарность мишени и зондов полная, то за это время накопится достаточное количество продуктов лигирования для обнаружения электрофорезом или ELISA. При неполной комплементарности продуктов лигирования не будет.

1. Синтез двух зондов



2. Гибридизация с ДНК

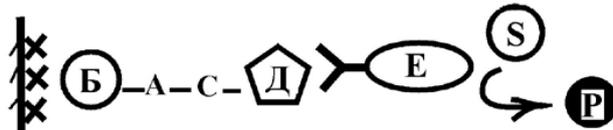


3. Добавление лигазы

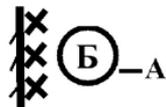


4. Денатурация и связывание зондов со стрептавидин-активированной поверхностью. Промывки

5. Проявка связавшихся зондов конъюгатом анти-Д иммуноглобулин-фермент (Е)



Результат с нормальной ДНК: окрашивание раствора



Результат с мутированной ДНК: нет окрашивания раствора

Рисунок 40. - Определение однонуклеотидной замены методом ПЦР-ЛОЗ:
Б – биотин; Д – дигоксигенин S – субстрат; Р – окрашенный продукт

Молекулярная диагностика – это быстро развивающееся направление.

Основные его принципы сформированы, но разработка новых технических деталей (миниатюризация образцов, высокоэффективный анализ с использованием технологий наночипов и пр.) могут существенно повысить его эффективность. Увеличение количества ДНК-мишени с помощью ПЦР позволила на несколько порядков повысить чувствительность анализа и открыла возможность детектирования, например, нескольких частиц вируса СПИДа, или проведения ранней пренатальной диагностики наличия

дефектного гена у плода, используя в качестве материала небольшое число клеток околоплодной жидкости.

В заключение необходимо отметить, что возможности, которые предоставляет анализ с помощью ПЦР, предъявляют повышенные требования к условиям его проведения. Существует даже английская поговорка «Garbage in, garbage out», иными словами, нуклеиновый анализ хорош ровно настолько, насколько высоко качество реагентов, составляющих реакцию смесь.

Важнейшим условием успешного анализа является устранение возможности контаминаций. Далее приведены основные правила проведения ДНК-анализа:

- обеспечение «чистого» пространства для проведения анализа: помещения с пониженным давлением воздуха; фильтрующие пипетки, блокирующие аэрозоли наконечники к пипеткам, UV-оборудованный ПЦР-блок;

- использование оборудования для защиты персонала: одноразовые перчатки и лабораторные костюмы, которые не выносятся из аналитического блока, для предотвращения попадания примесных ДНК или нуклеаз из внешней среды;

- использование технологии «горячего старта» для минимизации событий ошибочных праймингов;

- использование контролей в каждом тесте: внешние позитивные и негативные контроли отслеживают правильность условий анализа и контаминации, внутренний контроль отслеживает наличие ингибиторов в реакционной смеси.

Основы молекулярной терапии

Установление локализации и последовательности гена, мутации которого вызывают конкретные заболевания, а также самой мутации и современные способы ее тестирования позволяют диагностировать заболевание в нео- и даже пренатальный период развития организма. Это дает возможность смягчить проявление генетического дефекта с помощью медикаментозного лечения, диеты, переливания крови и т.д. Однако такой подход не приводит к исправлению самого дефекта и, как правило, наследственные заболевания не излечиваются. Ситуация осложняется еще и тем, что мутация одного гена может давать самые разные последствия на организм. Если мутация гена вызывает изменения активности фермента, который он кодирует, то это может привести к накоплению токсичного субстрата или, наоборот, к дефициту соединения, необходимого для нормального функционирования клетки. Хорошо известным примером такого заболевания является фенилкетонурия. Его вызывает мутация в гене печеночного фермента фенилаланиндегидроксилазы, катализирующего превращение фенилаланина в тирозин. В результате повышается уровень эндогенного фенилаланина в крови, что вызывает неправильное формирование миелиновой оболочки вокруг аксонов нервных клеток

центральной нервной системы и, как следствие, тяжелую умственную отсталость.

Если мутация затрагивает ген структурного белка, то это может приводить к серьезным нарушениям на уровне клеток, тканей или органов. Примером такого заболевания является кистозный фиброз. Делеция в гене, кодирующем белок, который называется транспортер кистозного фиброза, приводит к синтезу дефектного белка (отсутствие фенилаланина 508) и нарушениям транспорта ионов хлора сквозь клеточные мембраны. Одним из наиболее вредных последствий этого является то, что слизь, которая выстилает и защищает легкие, становится ненормально густой. Это затрудняет доступ к клеткам легких и способствует накоплению вредных микроорганизмов.

Клетки, выстилающие воздухоносные пути легких, погибают и заменяются фиброзной рубцовой тканью (отсюда название болезни). В результате пациент погибает от нарушения дыхания.

Наследственные заболевания отличаются сложными клиническими проявлениями, и их традиционное лечение имеет в основном симптоматический характер: для лечения фенилкетонурии назначают безаланиновую диету, дефектные белки заменяют функциональным внутривенным введением, для компенсации утраченных функций проводят трансплантацию костного мозга или других органов. Все эти меры, как правило, малоэффективны, дороги, длительны, и лишь немногие пациенты доживают до старости. Поэтому разработка принципиально новых видов терапии очень актуальна.

Генная терапия

Генной терапией называется генетическая инженерия соматических клеток человека, направленная на исправление генетического дефекта, вызывающего заболевание. Коррекция специфического заболевания осуществляется путем введения в дефектные соматические клетки нормальных экспрессирующихся генов. К 80-м гг., когда были разработаны методы получения отдельных генов и созданы эукариотические экспрессирующие векторы, стали рутинными эксперименты по переносу генов на мышах, перспективы генной коррекции стали реальными.

В 1990 г. в США доктором У. Френч Андерсоном (W. French Anderson) были предприняты первая попытка генотерапии для лечения тяжелого комбинированного иммунодефицита (ТКИД) у трехлетней девочки Ашанти де

Силва (Ashanthi da Silva). Это заболевание вызывается мутацией в гене, кодирующем аденозанаденилазу (АДА). Дефицит этого фермента способствует накоплению в крови аденозина и дезоксиаденозина, токсическое действие которых приводит к гибели В- и Т-лимфоцитов периферической крови и, как следствие, иммунодефициту. Дети с таким заболеванием должны быть защищены от любых инфекций (содержаться в специальных стерильных камерах), поскольку любая болезнь может

оказаться смертельной. Через 4 года после начала лечения у ребенка наблюдалась экспрессия нормально функционирующей АДА и облегчение симптомов ТКИД, что позволило ей покинуть стерильную камеру и жить нормальной жизнью.

Таким образом, была продемонстрирована принципиальная возможность успешной генетической терапии соматических клеток. Начиная с 90-х гг. проходят испытания генной терапии целого ряда генетических заболеваний, среди которых такие тяжелейшие, как гемофилия, СПИД, разные виды злокачественных новообразований, муковисцидоз и др. На данный момент поддаются излечению с помощью трансгенеза уже около 10 болезней человека.

Разнообразие генетических заболеваний предопределило развитие множества подходов генной терапии. При этом решаются 2 главные проблемы: средство доставки терапевтического гена; способ обеспечения адресной доставки к клеткам, предназначенным для коррекции. К настоящему времени все подходы к генной терапии соматических клеток можно разделить на две категории: терапия *ex vivo* и *in vivo* (рис. 41).



Рисунок 41. - Схема проведения генной терапии *ex vivo* (а) и *in vivo* (а)

Генная терапия *ex vivo* предполагает генетическое исправление дефектных клеток вне организма с последующим возвращением нормально функционирующих клеток в организм.

Генная терапия *in vivo* предусматривает доставку терапевтического гена непосредственно в клетки определенной ткани пациента. Рассмотрим эти подходы подробнее.

Генная терапия *ex vivo* включает следующие этапы:

- 1) получение дефектных клеток больного и их культивирование;
- 2) перенос нужного гена в изолированные клетки с помощью трансфекции терапевтической генной конструкции;
- 3) отбор и наращивание генетически исправленных клеток;
- 4) трансплантация или трансфузия этих клеток пациенту.

Использование собственных клеток пациента гарантирует, что после их возвращения у него не разовьется иммунный ответ. Процедура переноса

генной конструкции должна быть эффективной, а нормальный ген должен стабильно поддерживаться и непрерывно экспрессироваться.

Средством переноса генов, созданного самой природой, являются вирусы. С целью получения эффективных векторов для доставки генов в основном используют две группы вирусов – аденовирусы и ретровирусы (рис. 41). В генной терапии применяют варианты генетически обезвреженных вирусов.

Рассмотрим устройство и использование конструкций на основе ретровирусов. Напомним, что геном ретровируса представлен двумя идентичными одноцепочечными молекулами РНК, каждая из которых состоит из шести участков: два длинных концевых повтора (LTR) на 5' и 3' концах, некодирующая последовательность Ψ^+ , необходимая для упаковки РНК в вирусную частицу, и три участка, кодирующих структурный белок внутреннего капсида (gag), обратную транскриптазу (pol) и белок оболочки (env) (рис. 41, а).

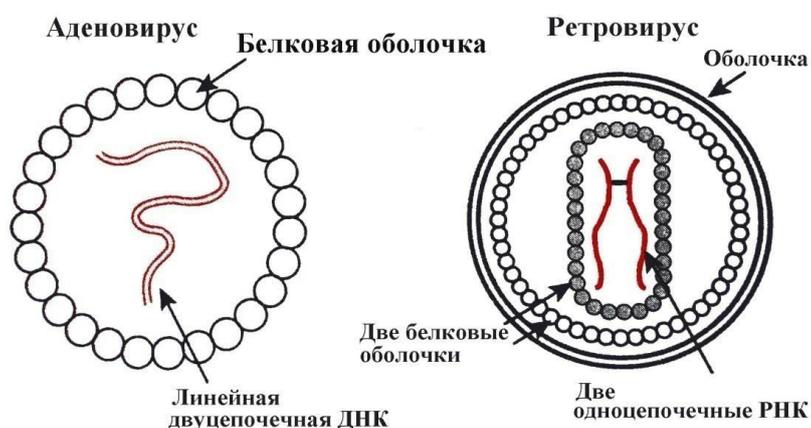


Рисунок 41. - Вирусы, применяемые для создания терапевтических векторов

Жизненный цикл ретровируса включает следующие стадии:

1. Инфицирование клеток-мишени.
2. Синтез ДНК копии генома с помощью собственной обратной транскриптазы.
3. Транспорт вирусной ДНК в ядро.
4. Встраивание вирусной ДНК в хромосому клетки-хозяина.
5. Транскрипция мРНК с вирусной ДНК под контролем сильного промотора, локализованного на участке 5'-LTR.
6. Трансляция белков Gag, Pol и Env.
7. Образование вирусного капсида и упаковки двух РНК-цепей и молекул обратной транскриптазы.
8. Высвобождение вирионов из клетки.

При генной терапии *in vivo* особенно важно обеспечить доставку терапевтического гена к дефектным клеткам. Такую адресную доставку могут обеспечить модифицированные векторы, созданные на основе вирусов,

способных инфицировать специфические виды клеток. Рассмотрим подход, разработанный для лечения уже упомянутого выше кистозного фиброза. Поскольку легкие являются открытой полостью, терапевтические гены к ним доставить относительно легко. Клонированный вариант здорового гена был введен в инактивированный аденовирус (рис. 42). Специфика этого типа вируса заключается в том, что он инфицирует выстилку легких, вызывая простуду.

Сконструированный таким образом вирус испытывали, распыляя его в нос и легкие экспериментальных животных, а затем людей-пациентов. В некоторых случаях наблюдалось введение и экспрессия здорового гена, и восстановление нормального переноса ионов хлора. Возможно, этот подход (введение нормального гена с помощью носовых аэрозолей) в ближайшем будущем будет широко использоваться для лечения симптомов кистозного фиброза в легких.

Кроме ретро- и аденовирусов в экспериментах по генной терапии используют и другие типы вирусов, например вирус *Herpes simplex*. Особенностью этого двунитевого (152 тыс. п.о.) ДНК-вируса является его способность специфически поражать нейроны. Известно множество генетических заболеваний, поражающих центральную и периферическую нервную систему – опухоли, метаболические нарушения, нейродегенеративные заболевания (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона). Вирус простого герпеса I типа (HSV) является весьма подходящим вектором для терапии таких заболеваний. Капсид этого вируса сливается с мембраной нейрона, и его ДНК транспортируется в ядро. Предложено несколько способов переноса терапевтического гена с помощью HSV-векторов и проведены успешные испытания на экспериментальных животных.

Вирусные векторы имеют несколько недостатков: высокая стоимость, ограниченная клонирующая емкость и возможная воспалительная реакция.

Так, в 1999 г. в результате развившегося необычайно сильного иммунного ответа на введение аденовирусного вектора погиб 18-летний доброволец, принимавший участие в испытаниях препарата. В 2002 г. у двух детей во Франции во время лечения от иммунодефицита (введением терапевтических генов в стволовые клетки с помощью ретровирусов) развилось состояние, похожее на лейкемию. Поэтому разрабатываются невирусные системы доставки генов. Самый простой и неэффективный способ – это инъекция плазмидной ДНК в ткани. Второй подход – это бомбардировка тканей микрочастицами золота (1–3 мкм), конъюгированными с ДНК. При этом терапевтические гены экспрессируются в тканях-мишенях и их продукты – терапевтические белки – поступают в кровь. Основным недостатком этого подхода является преждевременная инактивация или разрушение этих белков компонентами крови.

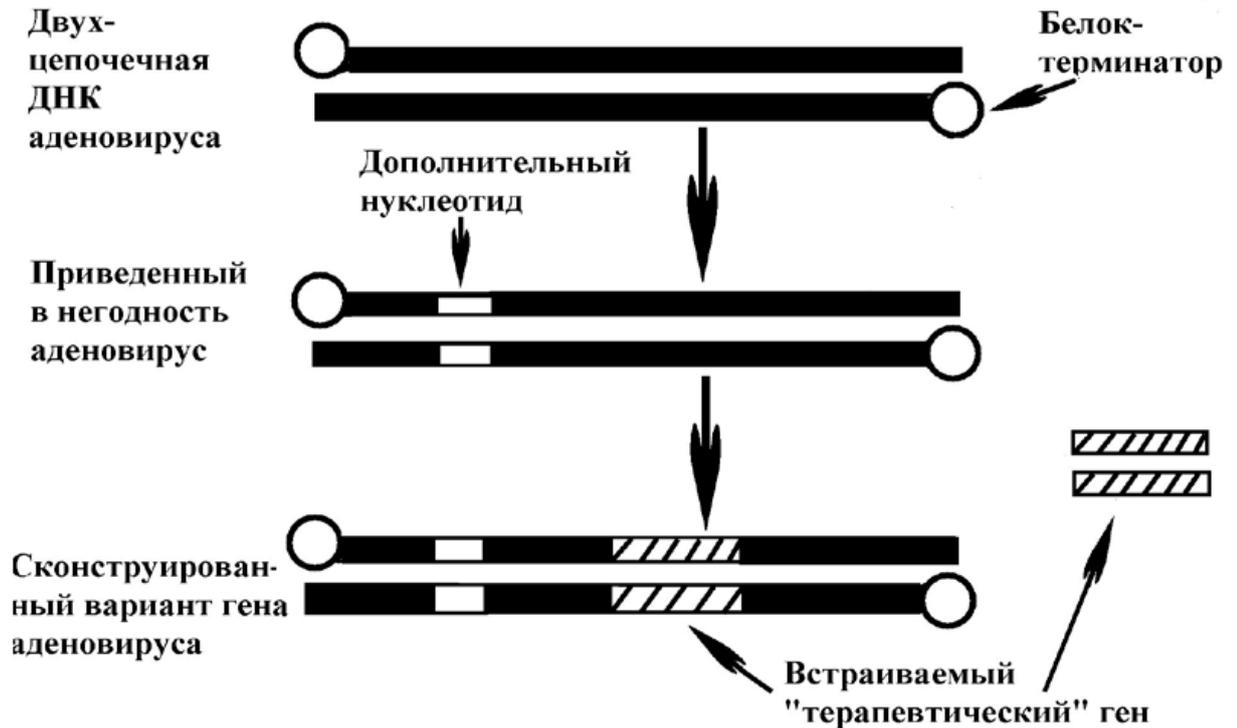


Рисунок 42. - Схема получения вектора на основе аденовируса

Доставку ДНК можно осуществить, упаковав ее в искусственную липидную оболочку. Полученные таким образом сферические частицы-липосомы легко проникают через клеточную мембрану. Созданы липосомы с самыми разными свойствами, однако пока эффективность такой доставки невысока, поскольку большая часть ДНК подвергается лизосомному разрушению. Также для доставки генетической конструкции синтезируют конъюгаты ДНК с различными молекулами, способными обеспечить ее сохранность, адресную доставку и проникновение в клетку.

В последние годы проводятся интенсивные эксперименты по созданию искусственной 47-й хромосомы, которая позволила бы включить большое количество генетического материала с полным набором регуляторных элементов для одного или нескольких терапевтических генов. Это дало бы возможность использовать геномный вариант терапевтического гена и тем самым обеспечить его стабильность и эффективную длительную экспрессию.

Проведенные эксперименты показали, что создание искусственной хромосомы человека, содержащей терапевтические гены, вполне реально, однако пока непонятно, каким образом вводить такую огромную молекулу в ядро клетки-мишени.

Основными проблемами, которые стоят перед генной терапией, помимо риска тяжелой иммунной реакции, являются трудности длительного хранения и функционирования терапевтической ДНК в организме пациента, мультигенность многих болезней, делающая их трудной мишенью для генной терапии, а также риск использования вирусов в качестве векторов.

Клонирование человека

Вряд ли в наше время найдется человек, незнакомый с фантастическими рассказами и фильмами о человеческих клонах, творящих то добро, то зло, используемых недалёковидными политиками или тупыми солдафонами.

Современный уровень знаний и методы манипулирования с генетическим материалом, получение различных трансгенных животных создают впечатление, что клонирование человека – дело не столь отдаленного будущего.

Привлекательность идеи получения копий животных с улучшенными полезными свойствами или копий гениальных людей, или просто живой копии погибшего дорогого человека подогревает интерес к проблеме. Процедура клонирования млекопитающих в принципе заключается в следующем: в энуклеированную (лишенную ядра) яйцеклетку вводят ядра соматических клеток донора и развивающиеся яйцеклетки на стадии бластоцист вносят в матку суррогатной матери. При этом будет получено потомство с тем же генотипом, что и у донора, или, другими словами, его генетический клон. Именно так была получена клонированная овечка Долли. Однако, как показали многочисленные эксперименты, проблема клонирования не так проста, как первоначально думали, имеется множество «подводных камней» и рано строить рассчитанные под клоны коровники. Разговоры же о клонировании человека лишены оснований и безответственны.

Нерешенными остаются главные вопросы.

1. Способны ли ядра соматических клеток полностью и эквивалентно заменить ядра зародышевых клеток в их функции обеспечения нормального развития зародыша? Соматические клетки – это специализированные клетки, прошедшие определенный цикл развития, затрагивающий, в том числе, и модификацию ДНК (изменения в некодирующих повторах, укорачивание теломер и пр.). Тщательный молекулярно-генетический анализ функционирования ядер пересаженных соматических клеток показал, что 4 % генов работают неправильно, включаются не в том месте, не в то время или не включаются вовсе. Как вернуть изменившиеся ядра клеток в исходное состояние, «поймать» такую соматическую клетку, ядро которой не утратило свой потенциал?

2. Какова вероятность полного сходства потомков? Даже если удастся получить нормально развивающиеся эмбрионы, условия их развития в матке различных приемных матерей будут различаться. Существующие определенные пределы колебаний проявления данного гена в фенотипическом признаке неизбежно приведут к тому, что одинаковые гены будут проявляться по-разному и вероятность получения полного сходства потомков крайне мала.

3. Даже если развивающиеся яйцеклетки трансплантировали сотне приемных матерей и получили хотя бы одну-единственную живую и точную копию индивида (процент успеха крайне низок!), встанет вопрос: а что с

остальными зародышами? Часть неизбежно погибнет, а остальные – уроды? И как поступить с этими искусственно созданными несчастными? Запрет такого рода исследований как аморальных является вполне естественным. В нашей стране на манипуляции с человеческими зародышами принят мораторий.

Репродуктивное клонирование человека запрещено, но вопрос о терапевтическом клонировании остается открытым. Суть его заключается в следующем: ядро соматической клетки пациента трансплантируется в яйцеклетку донора, выращивается до стадии бластоцисты, внедряется в стенку матки.

Внутри содержится так называемая внутренняя клеточная масса из эмбриональных стволовых клеток, из которых развиваются органы и ткани зародыша. Предполагается, что благодаря их колоссальному потенциалу к развитию в разных направлениях, из них можно будет получать «запчасти» для пересадки пациенту – хозяину ядра. Но что это за запчасти, если 4 % генов будут работать неправильно? Ведь известно, что при пересадке эмбриональных стволовых клеток приблизительно у 30 % реципиентов развиваются опухоли.

И, кроме того, не надо забывать об этических проблемах, связанных с поисками доноров яйцеклеток и суррогатных матерей. В такой ситуации многие ученые высказываются в пользу проведения масштабных работ в этом направлении на экспериментальных животных и объявлении хотя бы временного моратория на использование этой техники в клинике и призывают проявлять максимум осторожности и аккуратности при решении проблем, связанных с клонированием человека.

4. ОСНОВНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К БИОРЕАКТОРАМ

Биотехнические системы представляют собой совокупность биологических и технических элементов, связанных между собой в едином контуре управления. В результате интеграции биологии и технических наук конструирование оборудования для реализации биотехнологических процессов стало специализированной областью биотехнологии, называемой *биоинженерия*.

Аппаратурное оформление технологических процессов производства продуктов биотехнологии и прежде всего микробиологического синтеза весьма разнообразно и во многом специфично. Специфические требования к оборудованию биотехнологической промышленности связаны с санитарно-гигиеническими вопросами и предотвращением контаминации, что имеет решающее значение при проектировании. В этой связи одним из основных требований к оборудованию микробиологического производства является его герметичность. Применение герметичных аппаратов, особенно для стадии культивирования биологических объектов, является важным условием качественного проведения процесса и получения стандартного продукта с высоким выходом.

Большое значение имеет правильный выбор материала, из которого изготовлено оборудование, поскольку компоненты материала могут оказывать как активирующее, так и ингибирующее действие на биосинтез биологически активных веществ. Еще одним важным требованием к оборудованию для биотехнологии является необходимость обеспечения высокой производительности. Чем больше производительность аппарата, тем меньше требуется сложных автоматических приборов контроля и регулирования параметров процесса, запорной аппаратуры, трубопроводов и др. Оборудование должно быть рассчитано на проведение непрерывных процессов, поскольку это создает возможность интенсифицировать и автоматизировать биотехнологические процессы.

Важной особенностью биотехнологии является проведение основной технологической стадии (стадии ферментации) в водной среде, при постоянном перемешивании и вибрации, а также меняющихся параметрах (рН, температуры, ионной силы среды и др.). Эти обстоятельства определяют схожесть процессов приготовления питательных сред для микроорганизмов, проведения биосинтеза и выделения целевых продуктов и обуславливают создание универсальных установок, позволяющих осуществлять без серьезной переналадки большое количество процессов, производящих ценные продукты.

Биотехнологическая установка (ферментер, биореактор) состоит из стандартных модулей, реализующих типовые операции. Их конкурентоспособность по сравнению с установками, проектируемыми конкретно для заданного технологического процесса, определяется тем, что в них заранее заложена возможность быстрой замены технологий в широком

диапазоне, в зависимости от меняющихся потребностей рынка. Это сокращает вынужденный простой установки и связанные с ним нерациональные накладные расходы. Использование модульного принципа в биоинженерии позволяет добиться высокой степени заводской готовности оборудования и снижает затраты на его изготовление и монтаж. Модульный принцип также предусматривает разработку и использование типовых алгоритмов и программ оптимального управления оборудованием, модулей с использованием микропроцессоров, а также пакета программ оптимального для управления выбранными технологическими процессами.

Использование возобновляемого сырья с одновременным производством ценных, например кормовых препаратов, существенно снижает себестоимость получаемого продукта, что также повышает конкурентоспособность модульных линий, а их малая мощность облегчает обеспечение ее экологической безопасности. Кроме того, предлагаемое сырье и процесс его подготовки предусматривают полную утилизацию твердых отходов, концентрирование и использование стоков, и возврат конденсата от их упаривания в технологический процесс. Модульные линии имеют определенные перспективы для выхода на международный рынок, поскольку есть достаточное количество средних и малых стран, испытывающих потребность в препаратах, но не имеющих достаточных средств для создания крупных предприятий.

Однотипность модулей позволяет объединять их в сети, в которых отдельные функции линии могут быть сосредоточены в специализированных подразделениях.

Важнейшей задачей биотехнологического производства является получение максимального выхода *целевого продукта*. Для достижения этой цели процесс ферментации должен проходить в оптимальных условиях, которые создаются с помощью ферментационного оборудования и той инфраструктуры, которая обеспечивает его функционирование. В этой связи на первый план выдвигаются задачи, связанные с устранением заражения культуры посторонней микрофлорой и обеспечения качественного управления процессом культивирования.

Заражение культуры микроорганизмов или клеток посторонней микрофлорой приводит к прямым экономическим потерям, причем в ряде случаев очень значительным. Поэтому при выборе ферментационного оборудования в первую очередь обращают внимание на надежность обеспечения асептики процесса культивирования. Другое важное требование относится к процессу стерилизации питательной среды. Питательная среда не должна быть «перегрета» при тепловой стерилизации, что приводит к деструкции таких ее компонентов, как витамины и аминокислоты, а результатом этого становится замедление роста культуры и падение продуктивности. Стерилизация питательной среды должна проводиться в автоматическом режиме. Практика показывает, что ошибки оператора являются главной причиной отсутствия стерильности питательной среды. Процессы, протекающие при ферментации, требуют непрерывного

управления.

Всевозрастающая потребность отраслей народного хозяйства в продуктах микробиологического синтеза обуславливает разработку новых принципов подхода и к проектированию технологических линий микробиологических производств. Особенности такого подхода являются выяснение на этапе проектирования большого числа альтернативных вариантов технологических схем, возможных типов оборудования и формирование наиболее оптимальных из числа рассматриваемых схем. Очевидно, что разработка технологических линий в первую очередь должна осуществляться с учетом функционально-целевого назначения системы, особенностей продукта производства и совокупности ограничений, налагаемых спецификой объекта на структуру и функции системы.

Создание новой технологии начинают с выбора аналитических методик. Затем полученные сведения суммируются в лабораторной методике получения продукта. Далее с использованием лабораторного оборудования изучается динамика процессов, определяется критерий оптимальности, подбираются оптимальные параметры всех технологических операций и даются рекомендации по использованию промышленного технологического оборудования, оцениваются объемы отходов, стоков и выбросов, определяются их параметры, даются рекомендации по их использованию. На основе результатов этих исследований готовится нормативная документация на производство, патентуется способ производства.

Итогом работы является лабораторный технологический регламент, который может использоваться для подготовки исходных данных на проектирование либо опытно-промышленной установки, либо опытного производства. Если полученные в лаборатории данные не позволяют с достаточной степенью уверенности осуществить расчетным путем масштабирование для серийного производства, проводятся опытно-промышленные работы, для чего создается опытно-промышленная установка. На ней производится отработка технологического процесса с использованием образцов промышленного оборудования уменьшенных размеров, которые, однако, должны обеспечить сохранение достигнутых показателей при промышленном производстве. При этом нарабатываются опытные партии продукции и проводятся их промышленные испытания, организуется анализ рынка, определяются технико-экономические показатели.

По результатам работы составляется опытно-промышленный регламент, который кладется в основу исходных данных на проектирование промышленного предприятия. Начиная с этого момента, можно говорить о наличии новой технологии.



Рисунок 43. - Система биотехнологического производства

При осуществлении микробиологического синтеза можно выделить пять стадий производства. Это, прежде всего, *стадии приготовления питательной среды и поддержания чистой культуры*, которые могли бы постоянно или по мере необходимости использоваться в процессе. Поддержание чистой культуры штамма продуцента – главная задача любого микробиологического производства, поскольку высокоактивный, не претерпевший нежелательных изменений штамм может служить гарантией получения целевого продукта с заданными свойствами. Третья стадия – *стадия ферментации*, на которой происходит образование целевого продукта. Реализуется микробиологическое превращение компонентов питательной среды сначала в биомассу, затем, если это необходимо, в целевой метаболит. На четвертом этапе *из культуральной жидкости выделяют и очищают целевые продукты*. Для промышленных микробиологических процессов характерно, как правило, образование очень разбавленных растворов и суспензий, содержащих, помимо целевого, большое количество других веществ.

При этом приходится разделять смеси веществ очень близкой природы, находящиеся в растворе в сравнимых концентрациях, весьма лабильных, легко подвергающихся термической деструкции. Заключительная стадия производства – приготовление товарных форм продуктов. Общим свойством большинства продуктов микробиологического синтеза является их недостаточная стойкость к хранению, поскольку они склонны к разложению и в таком виде представляют прекрасную среду для развития посторонней микрофлоры. Это заставляет принимать специальные меры для повышения сохранности препаратов промышленной биотехнологии.

Характеристика газожидкостных биореакторов

Несмотря на многообразие конструкций биореакторов, все они должны удовлетворять основным требованиям для поддержания эффективного процесса культивирования клеток, обеспечивая: подвод к каждой клетке в достаточном количестве всех питательных веществ; отвод от каждой клетки продуктов метаболизма; термостатирование микробной суспензии в каждой точке; поддержание оптимальных рабочих параметров; требуемый уровень аэрирования, перемешивания; высокий уровень автоматизации процесса культивирования, техники безопасности и условий труда операторов.

Для выполнения этих требований каждый ферментер должен быть снабжен следующими системами:

- подачи жидкостных (или сыпучих) потоков в аппарат;
- ввода и вывода газовых потоков;
- аэрирования ферментационной среды;
- перемешивания ферментационной среды;
- пеногашения;
- термостатирования;
- стерилизации ферментера и ферментационной среды;
- вывода потоков из аппарата;
- контроля и регулирования заданных параметров процесса.

Барботажные биореакторы. Наибольшее использование в предшествующие годы получили барботажные биореакторы с принудительным диспергированием газа (рис. 44). Они представляют собой вертикальную емкость, в основном цилиндрической формы, снабженную теплообменником, барботером и технологическими штуцерами. Характерным признаком работы барботажного реактора является неорганизованная и слабая циркуляция жидкости.

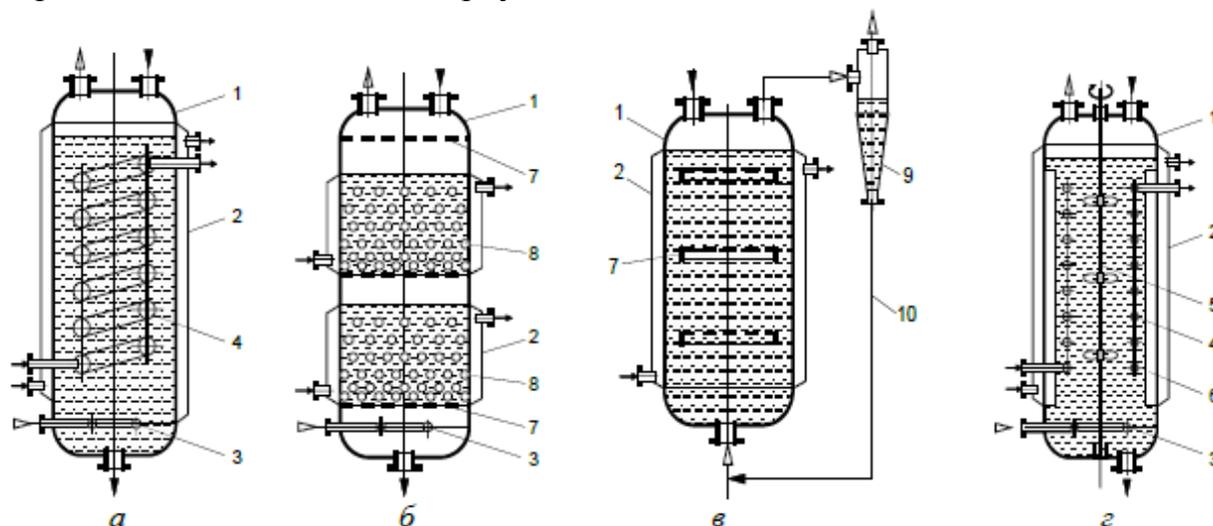


Рисунок 44. - Барботажные биореакторы: 1 – корпус; 2 – рубашка; 3 – барботер; 4 – теплообменник; 5 – механическое перемешивающее устройство; 6 – ребра; 7 – решетка; 8 – подвижная насадка (гранулы); 9 – сепаратор; 10 – циркуляционный

контур

Пропускная способность аппарата по газу лимитируется его приведенной скоростью, которая обычно не превышает 0,1 м/с. При более высоких скоростях значительно возрастает газосодержание, что приводит к неоправданному увеличению общего объема реактора. Возникают пульсации давления и вибрации аппарата. Газосодержание барботажного слоя изменяется как по высоте, так и по сечению аппарата. При наличии в жидкости поверхностно – активных веществ над барботажным слоем независимо от режима движения образуется слой стабильной пены, который оказывает отрицательное воздействие на процесс ферментации.

В аппаратах рассматриваемого типа количество кислорода, доставляемого в жидкую фазу, определяется величиной межфазной поверхности, развиваемой в результате массового прохождения пузырьков газа сквозь слой жидкости.

Однако скорость переноса кислорода в жидкой фазе так же, как и скорость отвода продуктов метаболизма, оказывается весьма низкой и не превышает 0,7 кг O₂ / (м³/ч), а расход воздуха в связи с этим достигает 50 м³ / (м³/ч). Применение реакторов с принудительным диспергированием газа большой высоты (10–25) м для увеличения степени насыщения культуральной жидкости газом (рис. 44, в), а также аппаратов с подвижной насадкой (рис. 44, б) требует больших энергозатрат на компримирование газа.

Увеличить скорость переноса газового субстрата в аппаратах барботажного типа можно путем применения перемешивающих устройств (рис. 44, г). Для этой цели используются различные типы мешалок, что не только увеличивает межфазную поверхность, но и обеспечивает дополнительную турбулизацию жидкой фазы. Эксплуатация аппаратов барботажного типа с мешалками показывает, что увеличение энергетических затрат не сопровождается адекватным повышением эффективности процесса. Лишь при подводимой удельной мощности, не превышающей 2–11 кВт/м³, рост эффективности массопереноса в жидкой фазе имеет приблизительно линейный характер. Дальнейшее увеличение мощности не приводит к уменьшению диаметра пузырьков газа и росту межфазной поверхности.

Одним из важнейших требований, предъявляемых к условиям проведения ферментации, является поддержание температуры в реакционной зоне на оптимальном уровне. Однако непрерывный отвод тепла из зоны реакции аппаратов барботажного типа с мешалками затруднен. Это обуславливает необходимость оснащения реакторов этого типа выносными теплообменниками, что приводит к еще большему увеличению энергозатрат.

Газлифтные биореакторы. Некоторое повышение тепло- и массообменных характеристик, по сравнению с барботажными аппаратами, достигается использованием газлифтных биореакторов (рис. 45), которые нашли наибольшее распространение в промышленной практике. Отличительной особенностью газлифтных аппаратов является наличие в

аппарате циркуляционного контура в виде одного (рис. 45, а) или нескольких стаканов (рис. 45, б) или газлифтных труб (рис. 45, в, г), в полости которых поддерживается повышенное газосодержание (0,5 – 0,6), что позволяет обеспечить циркуляцию газожидкостной смеси со скоростью 0,1–0,6 м/с. Для таких аппаратов характерны интенсивное пенообразование и высокий удельный расход воздуха.

Во время работы воздух проходит в аппарат по центральной трубе в кювету, где из подаваемого суслу и жидкости, содержащейся в нижней части аппарата, образуется газожидкостная смесь, которая движется по внутреннему циркуляционному контуру.

Часть воздуха отделяется от пены и выходит из аппарата через отверстие в крышке, а другая часть вместе с пеной опускается по кольцевому зазору между диффузором и стенкой. Основной причиной низкой эффективности аппаратов системы Лефрансуа – Марийе (рис. 34, а), является слабое диспергирование воздуха в жидкость. При достижении расхода воздуха 45–50 м³/(м²·ч) перерабатывается питательная среда с редуцирующими веществами менее 1,5 %, при объеме аппарата 600 м³ производительность, не превышает 6–7 т сухих дрожжей в сутки, скорость переноса составляет 1,1–1,2 кг О₂/(м³·ч).

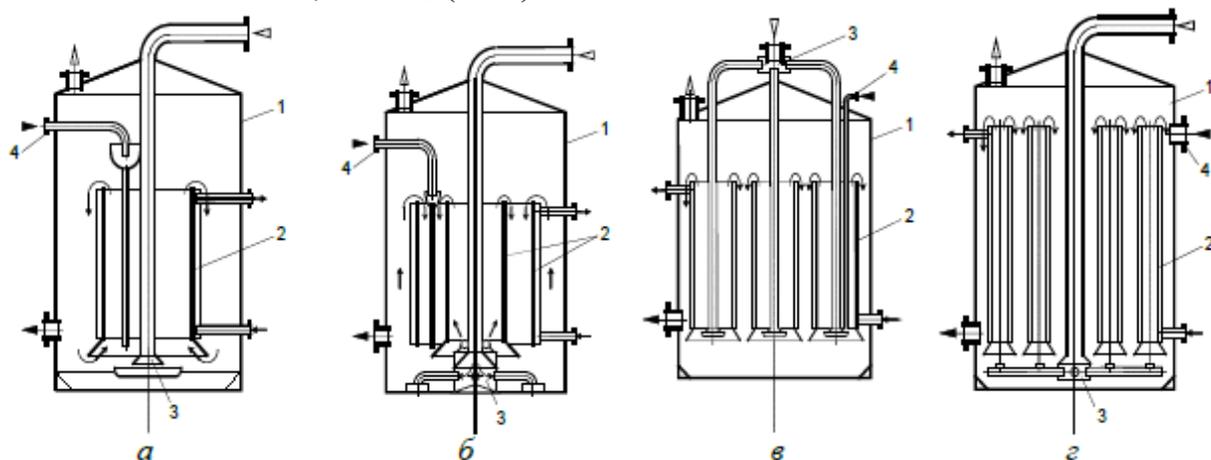


Рисунок 45. - Газлифтные биореакторы системы Лефрансуа – Марийе: 1 – корпус; 2 – циркуляционный стакан с рубашкой; 3 – система воздухораспределения; 4 – патрубок для подачи ферментативной среды

Струйные биореакторы. В струйных биореакторах используется эффект инжекции воздуха струей культуральной жидкости, вытекающей из насадки (сопла) со скоростью 6–8 м/с (рис. 46). Проникая вместе со струей жидкости на глубину до одного метра, газ дробится на мелкие пузыри, образуя газожидкостную систему с развитой межфазной поверхностью. Разработано около десятка конструкций струйных биореакторов со сплошной или кольцевой струей жидкости (сплошная струя образуется при истечении жидкости из цилиндрического патрубка, кольцевая – из кольцевого зазора, образованного патрубком и цилиндрической вставкой). При внедрении струи в жидкость происходит захват газа ее поверхностью и образование аэрируемой (барботажной) зоны. Поверхностный коэффициент

массоотдачи в струйных насадках составляет $(0,5-0,7) \cdot 10^{-4}$ м/с, высота зоны аэрации 0,2–0,4 м, диаметр газовых пузырьков в жидкости 1,8–5,0 мм.

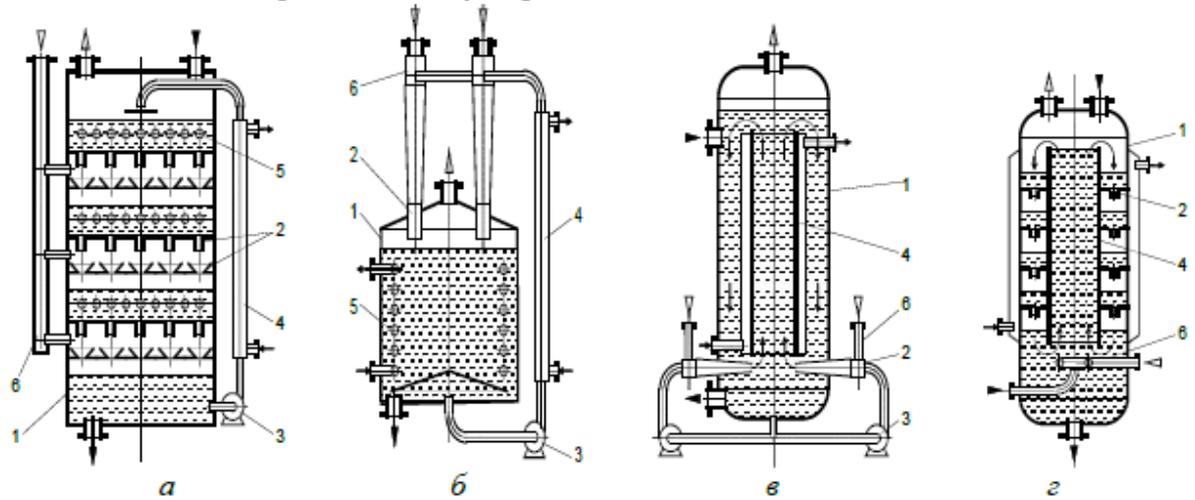


Рисунок 46. - Струйные биореакторы: 1 – корпус; 2 – струйная насадка (эжектор); 3 – насос; 4 – циркуляционный стакан (труба); 5 – теплообменник; 6 – воздуховод

Величина объемного коэффициента массоотдачи в биореакторе со струйной насадкой не превышает 210 ч⁻¹. Эксплуатация струйных биореакторов требует меньших (по сравнению с барботажными) удельных энергозатрат, однако небольшая скорость переноса кислорода в жидкой фазе не позволяет перерабатывать в них концентрированные среды (допустимая концентрация редуцирующих веществ в субстрате, как правило, не превышает 8 кг/м³), что приводит к увеличению габаритов и повышению эксплуатационных расходов. В струйных аппаратах, как и в аппаратах барботажного типа, ярко выражен эффект флотации биомассы, значительно снижающий интенсивность микробиологического синтеза. Конструктивные особенности струйных биореакторов не дают возможности отводить тепло непосредственно из зоны реакции, что обуславливает необходимость использования выносного теплообменника для обеспечения оптимального температурного режима процесса. Одним из наиболее существенных недостатков струйных аппаратов является неравномерное распределение газа в объеме жидкости.

Кроме того, для обеспечения оптимальной скорости течения струи необходима высота слоя жидкости, равная трем и более метров, что не позволяет обеспечить требуемое газосодержание.

Задача поддержания газосодержания по всему объему культуральной жидкости решена в струйном биореакторе с шахтным аэратором фирмы «Фогельбуш» (рис. 46, б). Равномерное распределение газо-жидкостной смеси достигается специальным насосом большой производительности, перекачивающим жидкость с высокой кратностью циркуляции (60–90 ч⁻¹) из емкости для культивирования в насадки, где осуществляется насыщение культуральной жидкости кислородом, путем вовлечения воздуха струей жидкости, перетекающей через верхний торец шахтного устройства. Большая

высота устройства обеспечивает высокую скорость жидкости, что дополнительно интенсифицирует процесс. Попытка интенсифицировать процесс массообмена путем использования эжекторов (рис. 46, в) приводит к резкому увеличению энергозатрат из-за поддержания высокого давления в линии подачи жидкости.

К общим недостаткам струйных биореакторов относят также плохой отвод тепла, флотирование биомассы, невозможность масштабирования, наличие большого количества насадок в аппарате.

Низкая концентрация микроорганизмов в объеме аппарата обуславливает большие расходы свежей воды и отработанной жидкости, очистка которой сводит на нет экономию энергии, полученную за счет энергии струй.

Биореакторы с самовсасывающими мешалками. Подвод и циркуляция газа осуществляется механическими перемешивающими устройствами, что позволяет многократно использовать газовый субстрат в замкнутом контуре аппарата и интенсифицирует процесс абсорбции труднорастворимых газовых субстратов. Такие аппараты перспективны для проведения процессов ферментации, абсорбции, окисления, при культивировании микроорганизмов на взрывоопасной газовой смеси, а также в случаях, когда в жидкости, через которую барботируют газ, присутствуют мелкие твердые частицы во взвешенном состоянии, которые могут перекрыть входные отверстия барботеров.

Одним из вариантов самовсасывающих устройств является мешалка с полым валом и трубчатыми лопастями. Она проста в изготовлении, не требует больших энергозатрат и может найти применение в случаях, когда количество газа, которое она засасывает, достаточно для проведения процесса.

В промышленном биореакторе объемом 800 м³, разделенном на 12 секций (рис. 47, в), ферментационная среда последовательно проходит все секции и из последней выходит культуральная жидкость с минимальным содержанием редуцирующих веществ и максимальной концентрацией биомассы. В каждой секции установлено перемешивающее и аэрирующее устройство – щелевая мешалка, состоящая из двух частей: узла для перемешивания жидкой фазы лопастями и интенсивного прохождения циркулирующей жидкости и узла для подвода газовой фазы. При вращении щелевой мешалки жидкость на выходе, обладая большой энергией, создает разряжение. В разряженную зону подсасывается воздух по трубопроводу, соединенному с полый частью этого узла. В зоне разряжения происходит интенсивное смешивание воздуха с жидкостью и ее насыщение кислородом.

Удельная мощность такого аппарата составляет 14,2 кВт/м³, приведенные энергозатраты на единицу абсолютно сухой биомассы – 4,0 кВт·ч/кг, расход воздуха на единицу рабочего объема – 113 м³/(м³·ч). Вследствие создания вакуума ограничивается глубина погружения щелевой турбины в жидкость. Малая величина вакуума не позволяет устанавливать на линии подсоса воздуха фильтрующие элементы, что может отражаться на

стерильности процесса ферментации. Самовсасывающие мешалки как устройства для ввода газа в жидкость имеют невысокий энергетический коэффициент полезного действия. Однако хорошее дробление газа, обеспечивающее большую площадь поверхности контакта фаз, ставит эти мешалки по удельным энергозатратам на один уровень с высокоэффективными диспергирующими устройствами.

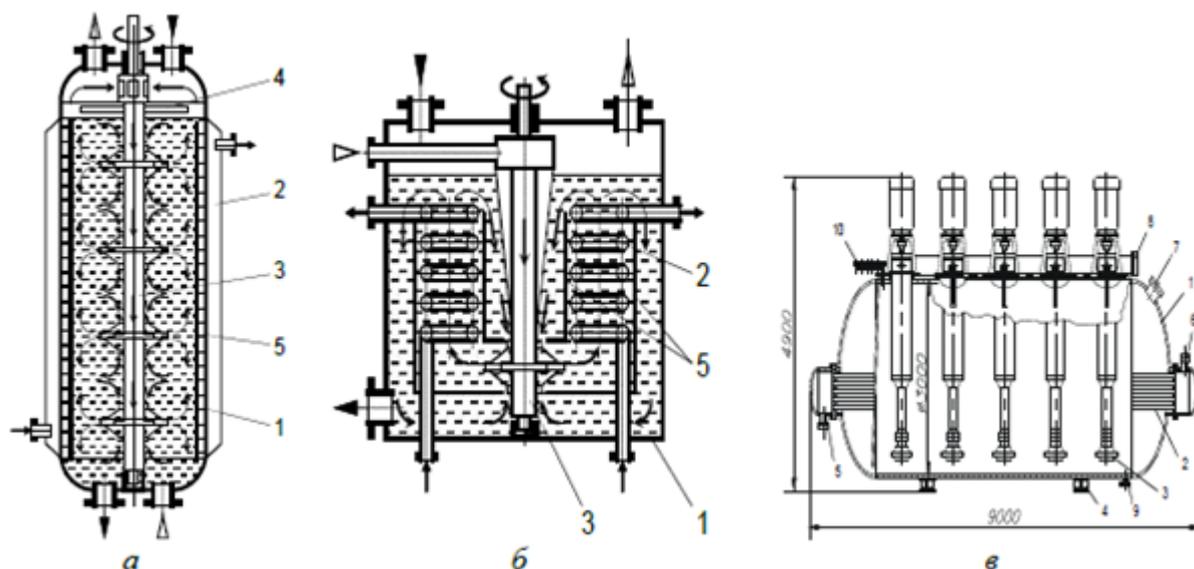


Рисунок 47. - Биореакторы с самовсасывающей мешалкой: (а) и (б): 1 – корпус; 2 – рубашка (теплообменник); 3 – полый вал с самовсасывающими мешалками; 4 – механический пеногаситель; 5 – циркуляционный стакан; (в): 1 – корпус; 2 – теплообменник; 3 – мешалка; 4 – опора; 5, 6 – штуцера; 7 – люк-лаз; 8, 9, 10 – коллекторы

Эффективность всасывающих устройств существенно зависит от глубины их размещения. Поскольку эта глубина обычно невелика, для обеспечения равномерного перемешивания в аппаратах с высоким уровнем жидкости, а иногда и большим объемом, на том же валу устанавливают дополнительную мешалку, т.е. наблюдается тенденция к созданию двух- и трехъярусных аэрирующих устройств (рис. 47, а), позволяющих более эффективно использовать газовую фазу.

Пленочные биореакторы. Большие перспективы имеют аппараты со стекающей турбулентной пленкой жидкости по внутренней поверхности трубы с винтовой шероховатостью (рис. 48). Скорость переноса кислорода в пленочных биореакторах достигает $10 \text{ кг}/(\text{м}^3 \cdot \text{ч})$ и более, поверхностный коэффициент массоотдачи – $(2-5) \cdot 10^{-2} \text{ м/с}$, что на порядок выше, чем в других биореакторах. Коэффициент теплоотдачи в турбулентной пленке, при высоких нагрузках по жидкости, в 2–3 раза превышает значения, полученные в барботажных и газлифтных аппаратах. В пленочных аппаратах достигается равномерное распределение температуры в объеме культуральной жидкости по причине пропускания всей ее массы через теплопередающую

поверхность, что исключает образование застойных зон.

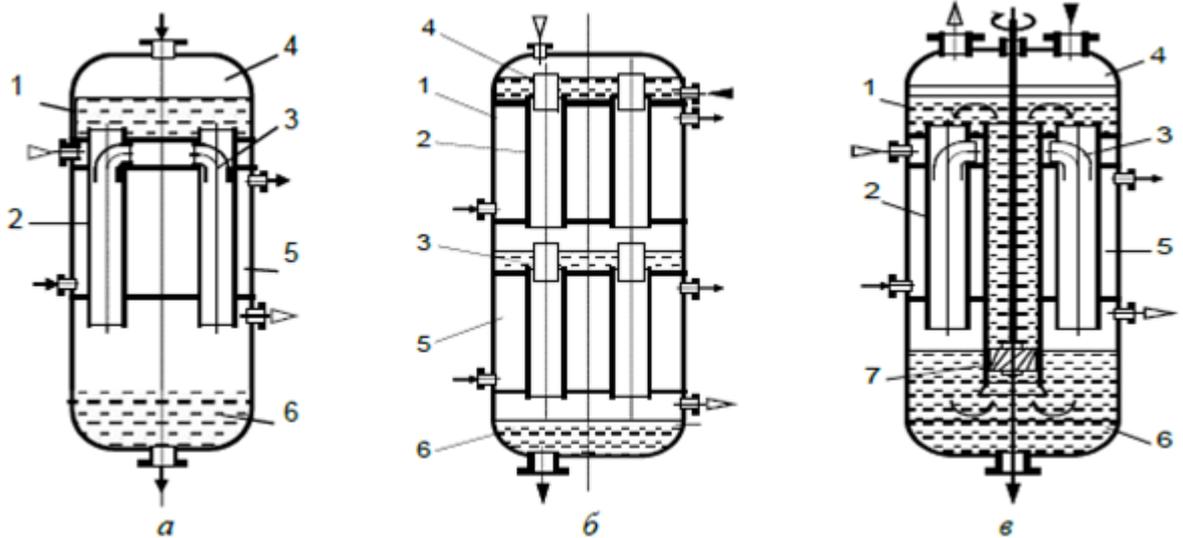


Рисунок 48. - Схемы пленочных трубчатых биореакторов: 1 – корпус; 2 – контактная труба; 3 – газовый патрубок; 4 – камера для ввода газа; 5 – теплообменная секция; 6 – камера для культивирования; 7 – насос

При этом отвод тепла организуется непосредственно в зоне биохимической реакции, что не требует дополнительных конструктивных решений и не влияет на процесс интенсификации тепло- и массообмена.

В пленочном биореакторе исключается накопление продуктов метаболизма, в частности CO_2 , в культуральной жидкости благодаря их интенсивному отводу из пленки и отсутствию циркулирующих пузырьков углекислого газа в объеме культуральной жидкости.

Проведение процесса ферментации в пленочных биореакторах возможно при низких расходах воздуха или чистого газа (O_2 , H_2), так как в этих аппаратах газ не участвует в создании поверхности контакта фаз и турбулизации жидкости. При этом снижаются потери газа в окружающую среду, вследствие его размещения в зоне контакта с пленкой. Из-за высокой скорости подвода кислорода, отвода тепла и продуктов метаболизма пленочные биореакторы способны перерабатывать концентрированные питательные среды (при концентрации редуцирующих веществ 10 % и более) и получать высокую производительность ($x = 50\text{--}100 \text{ кг/м}^3$). Это позволяет в несколько раз уменьшить габариты биореактора, снизить расход воды и газа, обеспечить их качественную очистку.

Газовихревые биореакторы. В биореакторе «Биок» (рис. 49) перемешивание суспензии бактериальных клеток осуществляется путем создания в рабочем объеме вращательного движения, генерируемого аэрирующим газовым субстратом, который подается в емкость над поверхностью суспензии клеток с одновременным его закручиванием в поток турбинкой. При этом перепад давления в потоке аэрирующего газа между периферией и центром вихря поддерживается в пределах 10–2 000 Па. Благодаря такому закручиванию аэрирующего газа, за счет трения на границе

раздела фаз и разницы давления между периферией и центром газового вихря, обеспечивается движение суспензии клеток в виде вихревого кольца, вращающегося относительно оси емкости с одновременным нисходящим движением жидкости на периферии емкости и восходящим в приосевой зоне. Аэрирующий газ взаимодействует с суспензией клеток только через свободную поверхность последней, не смешиваясь с ней. Энергия, необходимая для перемешивания суспензии клеток, подводится по всей поверхности жидкости, что позволяет реализовать режимы суспензионного культивирования культур, наиболее чувствительных к механическому воздействию. Газовихревой биореактор осуществляет мягкое перемешивание без образования пены, кавитации, высоко турбулентных и застойных зон.

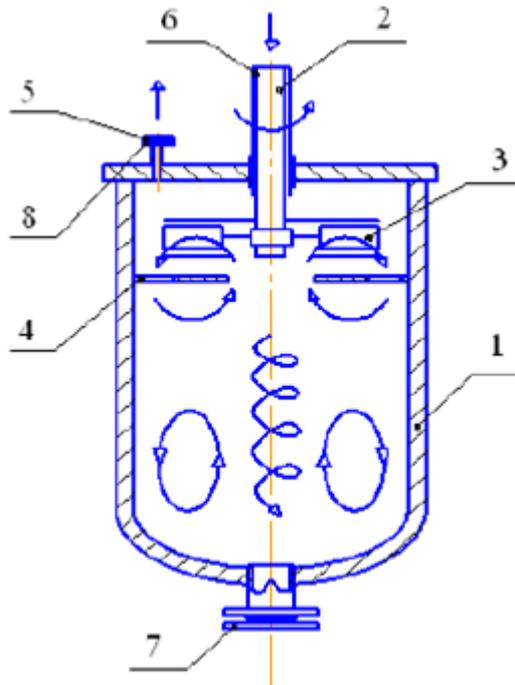


Рисунок 49. - Фотография и схема газовихревого биореактора: 1 – корпус; 2 – полый вал; 3 – турбинка; 4 – циркуляционная перегородка; 5, 6 – вывод и ввод газовог субстрата; 7, 8 – штуцера

Мембранные ферментеры. Эти реакторы перспективны с позиции расширения возможностей исследования и управления процессом ферментации, в котором развитие популяции происходит в постоянно обновляемой среде.

Это достигается за счет использования полупроницаемой мембраны.

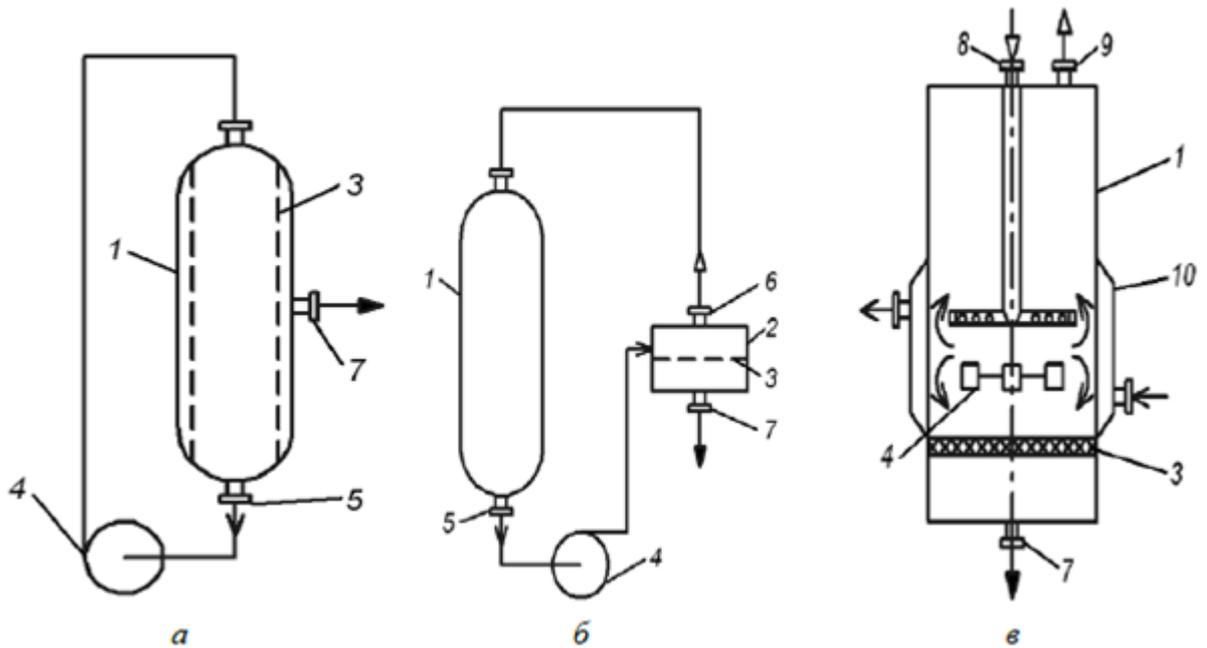


Рисунок 50. - Схемы мембранных биореакторов: 1, 2 – корпус; 3 мембрана; 4 – мешалка (насос); 5, 6, 7 – штуцера; 8, 9 – штуцера для газового субстрата; 10 – рубашка

В зависимости от типа мембраны различают три режима работы мембранных реакторов: режим диализа, режим ультрафильтрации и режим микрофильтрации. Две основные схемы организации работы мембранных реакторов (встроенной и вынесенной мембраной) приведены на рис. 50, а, б. Реактор со встроенной мембраной (рис. 50, а) выполняется обычно трубчатым, в нем поддерживается режим идеального вытеснения. Аппарат на рис. 50, б содержит вынесенный мембранный контур, а в установке поддерживается режим идеального смешения. Субстрат с постоянным расходом, пропорциональным выходу продукта, подают в систему. Фермент, фактически иммобилизованный в контуре, задерживается мембраной, которая свободно пропускает продукты реакции. В случае снижения активности катализатора в систему добавляют его новую порцию для поддержания скорости реакции на необходимом уровне.

Степень задержания мембраной фермента должна быть максимально высокой. Схема мембранного реактора для культивирования микроорганизмов «Елен-5» представлена на рис. 50, в. Преимущества мембранных реакторов состоит в достижении высокой концентрации клеток, в использовании как растворимых, так и не растворимых субстратов. Поток продуктов, выходящих из аппарата, свободен от клеток и других специфических материалов, что снижает стоимость их очистки.

5. ПРОИЗВОДСТВО ОДНОКЛЕТОЧНОГО БЕЛКА

Главной проблемой, стоящей перед человечеством (и, в частности, перед развивающимися странами), является взрывоподобный рост населения. В 1988 г. требовалось накормить 4 млрд «ртов», а в 2000 г. – 6 млрд. Естественно, что традиционное сельское хозяйство не сможет удовлетворить пищевые потребности растущей численности населения, особенно белковым питанием. Уже в настоящее время Международная Организация питания и сельского хозяйства (FAO) предсказывает резкое увеличение пропасти в обеспечении белком между развитыми и развивающимися странами. По меньшей мере 25% мирового населения в настоящее время страдает от голода или недостатка питания и несоразмерно большая часть этого населения живет в развивающихся странах, где засушливый климат и мало плодородные почвы затрудняют ведение продуктивного сельского хозяйства.

И тем не менее продуктивность сельского хозяйства во всех его отраслях постоянно повышается практически по всему миру. В этом процессе, конечно, определенную помощь окажут и различные биотехнологические новшества, призванные усовершенствовать традиционные сельскохозяйственные приемы. Даже сейчас во многих регионах Земли постоянно появляются пищевые излишки, особенно велико их количество в Северной Америке и Европе, где практически постоянна популяция людей. Кроме того, ряд стран, ранее являвшихся чистыми импортерами большинства пищевых продуктов (такие, как Индия и Индонезия), в настоящее время сумели наладить самообеспечение. И все же в мире имеет место несбалансированность в снабжении населения хлебом и этот недостаток постоянно усугубляется в связи с изменениями в неблагоприятную сторону глобальной погоды (в частности, сильные ливни, засухи), а также национальными и межнациональными войнами, сопровождаются разрушением сельского хозяйства и колоссальными перебоями в распределении питания.

По данным ряда специалистов, мировой дефицит белка оценивается в 30–35 млн т. Причем степень дефицита варьирует в зависимости от страны и должна рассматриваться в рамках каждой национальной экономики. Сдвиг от злаковой к мясной диете в различных странах приобретает разительные масштабы и ведет к увеличению расхода зерна в пересчете на человека, поскольку требуется от 3 до 10 кг зерна, чтобы произвести 1 кг мяса путем повышения эффективности животноводства и совершенствования кормовых программ.

Поиски дополнительных источников белка предпринимаются постоянно и повсеместно. Широко внедряются новые сельскохозяйственные приемы; получают новые сорта злаков, характеризующиеся повышенным содержанием белка; там, где это позволяют климатические и другие природные условия, интенсивно внедряется выращивание сои и земляного ореха; белки начинают экстрагироваться путем ультрафильтрации из

определенных жидких отходов; и наконец, разрабатываются новые нетрадиционные способы производства белковых соединений.

Определенные успехи достигнуты в получении белка с помощью микробного синтеза. Это направление получило название производства одноклеточного белка (SCP), поскольку большинство микроорганизмов, используемых для этих целей, растут в виде одноклеточных или мицелиальных (нитевидных) особей, а не как сложные многоклеточные организмы (растения или животные).

Понятие "съедобные микробы" звучит несколько странно, однако люди давно распознали питательную и вкусовую ценность некоторых микроорганизмов, а именно грибов. Но даже и в этом случае скептицизм и предвзятость оказывают существенное влияние на отношение людей к этому великолепному пищевому продукту. И в то время как во многих странах грибы достаточно широко употребляются в пищу, население других стран их игнорирует и избегает использовать.

Хотя грибы в настоящее время во многих странах выращиваются в довольно больших количествах и широко употребляются в пищу и рассматриваются как весьма перспективный и удобный способ производства пищевых продуктов, использование других микробов пока что менее приемлемо, так как существуют многие проблемы, не являющиеся по своей природе технологическими.

И все же на протяжении последних двух-трех десятилетий отмечается явный растущий интерес к использованию различных микроорганизмов для производства пищевых продуктов, в частности для скормливания домашним животным. Полагают, что применение одноклеточного белка, получаемого на дешевых субстратах, для корма животных окажет большое влияние на улучшение питания людей в результате снижения их конкуренции с животными за растительную пищу, богатую белком.

Преимущества микроорганизмов как продуцентов белка состоят в следующем: микроорганизмы обладают высокой скоростью накопления биомассы, которая в 500–5000 раз выше, чем у растений и животных; микробные клетки способны накапливать очень большие количества белка (дрожжи – до 60%, бактерии – до 75% по массе); в микробиологическом производстве вследствие высокой специфичности микроорганизмов отсутствует многостадийность процесса; а сам процесс биосинтеза осуществляется в мягких условиях при температурах 30–45°C, pH 3–6 и давлении около 0,1 МПа. Помимо всего прочего, микробиологический путь получения богатой белком биомассы менее трудоемкий по сравнению с получением сельскохозяйственной продукции и органическим синтезом белка.

Все эти преимущества и определили быстрое развитие технологии производства микробного белка, которое в настоящее время является самой крупнотоннажной отраслью биотехнологии и открывает возможность промышленной продукции различных кормовых добавок для животноводства и птицеводства с помощью микроорганизмов. Причем

получаемые продукты характеризуются высокой кормовой ценностью и в достаточных количествах. Большое число компаний во всем мире участвует в этих процессах и уже производится значительное количество достаточно ценных продуктов такого рода.

Основной целью продукции одноклеточного белка является его содержание в препарате. Однако следует иметь в виду, что помимо белка микроорганизмы содержат также и другие вещества: углеводы, витамины, нуклеиновые кислоты и различные минеральные соединения, часть из которых может оказывать и неблагоприятное действие на организм, при использовании в пищу человека или животных. Так, вследствие ограниченной способности человека деградировать нуклеиновые кислоты, прежде чем использовать одноклеточный протеин в качестве пищевого продукта, он должен подвергаться специальной обработке.

Тем не менее высокое содержание белка, слабый запах и мягкий вкус одноклеточного протеина в сочетании с легкостью хранения придают существенную ценность этому продукту питания. Кроме того, он с успехом может применяться в так называемых водных культурах: например на фермах для разведения креветок, форели, семги и т. п.

Преимущества микробного белка перед животным (в отношении быстроты получения) демонстрируются следующими цифрами: продукционная способность коровы весом в 250 кг и 250 г дрожжей практически одинакова. В то время как корова будет прибавлять в день по 200 г веса, микробы за этот же период времени способны произвести (теоретически, в идеальных условиях культивирования) до 25 т биомассы.

Однако корова обладает уникальной особенностью превращать (конвертировать) траву в богатое белком и другими ценными веществами молоко! Несмотря на многолетние попытки разработки конкурентоспособного способа подобного типа конверсии, все они остались пока безрезультатными. Поэтому коровы в настоящее время рассматриваются как "живые, самовоспроизводящиеся и съедобные «ферменторы»! Поэтому вопрос о замене коров микроорганизмами в пределах обозримого будущего остается открытым.

Применимость и токсикология одноклеточного белка

Помимо чисто технологических и экономических сложностей, существенное влияние на развитие производства одноклеточного белка оказывают географические, политические, социологические и психологические факторы, которые порой оказываются в значительной степени определяющими. В частности, большое внимание уделяется проблемам безопасности, питательной ценности и применимости данного продукта. Природа сырьевого материала, используемого в производстве одноклеточного белка, представляет известную опасность: например, потенциальная канцерогенность углеводородов нефти и н-парафинов, наличие тяжелых металлов или других загрязняющих примесей в минеральных солях, присутствие остатков растворителей после экстракции

продукта, а также токсинов (в частности, микотоксинов), образуемых некоторыми микроорганизмами (например, определенными грибами), и т. д. Поскольку организм-продуцент должен быть непатогенным и нетоксигенным, а его продукты метаболизма безвредными, строгий санитарный режим и различные процедуры контроля качества должны постоянно осуществляться в течение всего биотехнологического процесса в целях предотвращения порчи продукта, а также загрязнения его патогенными или токсигенными микроорганизмами.

Применимость одноклеточного белка как пищевого продукта для человека зависит не только от его безвредности и питательной ценности, но также и от ряда других факторов. Помимо обычного нежелания людей потреблять вещества, получаемые из микробов, процесс питания характеризуется многими неуловимыми психологическими, социальными и религиозными аспектами. У различных культур существует достаточное число специфических ассоциаций с едой, общественным положением, а также символической значимостью различных видов пищи. Должны также учитываться более явные особенности, связанные с применимостью продукта: запах, цвет, вкус, консистенция и внешний вид. Так, например, одноклеточный белок может использоваться в качестве пищи для человека, по-видимому, лишь при относительно малом его количественном содержании в обычных традиционных продуктах. Поэтому в настоящее время он может служить преимущественно как источник питания для различных видов домашних животных, птиц или рыб. И все же уже теперь некоторые промышленные процессы направлены на изготовление микробных продуктов для человека: например, грибной белок фирмы Ranks Novis McDougall/ICI.

Какие же факторы, помимо технологических, оказывают влияние на расширение производства одноклеточного белка? Главным образом это политические и социальные аспекты использования для его получения нефтепродуктов как субстратов для культивирования продуцентов, поскольку последние могут быть существенно загрязнены канцерогенными веществами. В силу этого обширные программы, связанные с производством одноклеточного белка, в Японии, Италии и

Британии в свое время были приостановлены и усилия биотехнологов были направлены на его производство из этанола или метанола либо на основе различных органических отходов, являющихся потенциально менее опасными.

Одноклеточный белок на высокоэнергетических субстратах

Представляющие существенное коммерческое значение как источники энергии материалы (нефтегаз, метанол, этанол, метан и n-алканы) привлекают внимание биотехнологов как субстраты ряда биотехнологических процессов, главными участниками которых являются бактерии и дрожжи. Естественно, что в разработке технологий использования подобных материалов принимают участие многие нефтяные компании, а сама проблема обсуждалась и изучается различными научно-

исследовательскими учреждениями. Наиболее подробно как сырье для получения одноклеточного белка изучался метан, хотя в настоящее время в его использовании для указанной цели имеется достаточно большое количество трудностей. В противоположность этому, большое значение придается метанолу. Так, компанией ICI в Великобритании разработана крупномасштабная (75 000 л) ферментация растительного сырья для метанол утилизирующих бактерий. Компании Hoechst (Германия) и Mitsubishi (Япония) также работают над аналогичными технологиями, предназначенными для использования в качестве продуцентов биомассы дрожжевых клеток вместо бактериальных.

Продукт, выпускавшийся компанией ICI (называемый прутин), использовался исключительно для скармливания животным. Метанол как источник углерода для получения одноклеточного белка обладает многими преимуществами по сравнению с n-парафинами; в нем отсутствуют потенциальные токсичные вещества, он легко растворим в водной фазе в любых концентрациях и при культивировании на средах с метанолом в получаемой биомассе отсутствуют какие-либо остатки углерода (хотя бы потому, что он легко испаряется). Кроме того, имеют значение и другие важные моменты технического порядка.

Завод компании ICI для производства прутина является единственным в своем роде в западном мире и в настоящий момент вследствие цен на метанол не работает с надлежащим экономическим эффектом, поскольку стоимость метанола составляет примерно 50% от стоимости продукта. В США стоимость одноклеточного белка, полученного на метаноле в 2–5 раз дороже, чем при его производстве из рыбной муки. На Среднем Востоке низкая стоимость метанола и относительно высокие цены на рыбную муку в сочетании с необходимостью производства большого количества животных продуктов делают одноклеточный белок типа ICI-прутина весьма привлекательным.

Относительно благоприятная ситуация для производства одноклеточного белка на n-парафинах нефти сложилась в 70-е годы в бывшем Советском Союзе, что было связано с низкими внутренними ценами на нефть. Были построены три крупных завода по культивированию дрожжей рода *Candida* (в том числе один в Новополоцке). В лучшие годы продукция дрожжевого белка достигала 1 млн т сухой биомассы и обеспечивала потребности сельского хозяйства (добавка в корм животных) и промышленности. Но в середине 80-х все эти заводы остановились в связи с высокой себестоимостью микробного белка (цена была в 2 раза выше, чем кормовой соевый белок).

Широкий спектр исследований, выполненных в 1960-е и 1970-е годы по использованию метанола и сходных соединений в качестве субстратов для получения одноклеточного белка, дали существенный стимул совершенствованию ферментационных технологий, направленных на его производство в крупномасштабных количествах. Упомянувшееся выше аэробное производство прутина является самым крупным из непрерывных

процессов и, по существу, представляет собой крупнейшую в мире биотехнологическую систему, что в свою очередь, вследствие необходимости строжайшей экономии, обусловило прогресс в разработках биореакторов с восходящим воздушным потоком (эрлифтных ферменторов).

Весьма подходящим сырьем для получения одноклеточного белка, предполагаемого к использованию в пищу человека, является этанол. В скором времени перспективы производства одноклеточного белка на этаноле будут определяться рядом локальных факторов: возможностями расщепления этилена, наличием излишков углеводов сельскохозяйственного происхождения, политическими ситуациями в региональной экономической самостоятельности, а также состоянием уровня мирового производства.

Одноклеточный белок на отходах

Рециклизация отходов растений, появляющихся в различного рода производствах (таких, как солома, выжимки, отходы цитрусовых, сыворотка молока, меласса, навоз животных и бытовые сточные воды), представляет существенную проблему биотехнологии. В отдельных местах количество таких отходов достигает значительных величин, что является источником серьезного загрязнения различных водных систем и вообще окружающей среды. Поэтому использование указанных органических отходов может способствовать достижению двух целей: снижению загрязнения и созданию пищевого белкового препарата.

Привлекательность растительных отходов, содержащих углеводы, состоит в их низкой стоимости, в результате чего удешевляется биотехнологический процесс, а также в том, что одноклеточный белок может быть получен при относительно небольшом количестве операций.

Обоснованием для разработки технологии производства одноклеточного белка на растительных отходах является их пригодность для микробной конверсии, наличие в достаточных количествах и в течение длительного периода, а также уровень уже имеющихся технологий. Процессы, использующие продукты отходов в производстве одноклеточного белка, базируются на основании коммерческих соображений с применением различных дрожжевых организмов в подходящих ферменторных системах. Субстратами для организмов-продуцентов служат: меласса (*Sacharomyces cerevisiae*), молочная сыворотка в производстве сыра (*Kluyveromyces fragilis*), отходы крахмального производства с использованием двух видов дрожжей (*Endomycopsis fibuligera* и *Candida utilis*). Питательная ценность дрожжей, получаемых в данном процессе, была определена в многочисленных обширных экспериментах по скармливанию этого одноклеточного белка различным видам животных (свиньям, цыплятам и телятам). В проведенных опытах регистрировался хороший рост животных и отсутствие неблагоприятных последствий.

Заслуживает внимания новый продукт – Рeкiло, представляющий собой грибной белок, получаемый путем ферментации углеводов мелассы, молочной сыворотки, отходов фруктов, гидролизатов древесины или

сельскохозяйственного сырья. Продукт характеризуется хорошим аминокислотным составом и богат витаминами. Испытания на животных показали, что Реkilo-протеин является хорошим источником белка в питании свиней, телят, бройлеров, кур-несушек и производится при непрерывном культивировании. Используемый для его производства организм является мицелиальным грибом, а получаемый продукт обладает выраженной фиброзной структурой, что делает готовый препарат удобным для применения.

В Британии компания Ranks Novis McDoudall совместно с корпорацией ICI поставляет на рынок другой грибной белок (mucorprotein), получаемый при выращивании гриба *Fusarium* на простых углеводах.

Непохожий почти ни на один из других типов, одноклеточный белок микопротеин производится для употребления в пищу людей. Продукт также производится путем непрерывной ферментации. Разработка и внедрение данного микопротеина (получаемого с помощью гриба *Fusarium* фирмой Ranks Novis McDoudall) оценивается по произведенным затратам более чем в 40 млн. фунтов стерлингов, а осуществление проекта заняло свыше 20 лет. Первоначально процесс осуществлялся посредством одноразовой ферментации, но затем была разработана технология непрерывного культивирования. Кульминацией проекта считается не только продукция грибной биомассы, но и получение ценных для пищевого продукта характеристик.

Целлюлоза в сельскохозяйственных и лесных материалах, а также в различных отходах должна составить в недалеком будущем основной сырьевой компонент для многих биотехнологических процессов, включая и одноклеточный белок. Целлюлоза в ее естественной ассоциации с лигнином до сих пор является наиболее распространенным органическим веществом для биологической конверсии. Различные исследовательские учреждения настойчиво изыскивают пути предварительной обработки биологических материалов подобного рода с целью деструкции лигнинового барьера (преимущественно физическими и химическими методами).

Удаление лигнина из лигноцеллюлозы делает последнюю потенциальным источником энергии для жвачных животных, способных использовать ее в качестве пищи. Таким путем лигноцеллюлозные материалы (солома, выжимки и даже древесина) могут стать полезными кормовыми препаратами для животных.

Многие виды грибов долгое время служили пищей для человека и выращивались на лигноцеллюлозных материалах. Данные процессы являются примерами низкоэнергетических технологических систем.

Процессы различаются по типу используемого субстрата или получаемого продукта, а также по степени изощренности (изобретательности) методологии процесса. В то время как большинство процессов получения одноклеточного белка основано на жидкостных ферментациях, многие из современных способов деградации целлюлозы базируются на ферментации с пониженным увлажнением, известной под

термином «твердофазная ферментация».

Во многих странах некоторая часть соломы, получающейся в сельскохозяйственных производствах, традиционно используется для компостирования с лошадиным навозом для получения субстрата, пригодного при выращивании грибов (*Agaricus lisporus*). Ежегодно "грибная" промышленность Британии потребляет около 300 000 т соломы для приготовления компоста, на котором выращивают грибы. Технологии, основанные на использовании микроорганизмов и методов биохимической инженерии в целях производства больших количеств биомассы, напоминают сельскохозяйственное производство. Однако так называемый "грибной процессинг", рассматриваемый в качестве примера общей биотехнологии, считается какой-то пренебрежительной областью "новых" биотехнологических разработок, хотя большое число съедобных грибов в настоящее время выращивается искусственным путем в различных странах мира. Новинки в эту область стали проникать сравнительно недавно, однако "вознаграждение" в скором будущем окажется, по оценкам специалистов, огромным. Биотехнология, как ни странно, не всегда должна быть высоко технологичной. В развивающихся странах, где дорогостоящие системы могут оказаться неприемлемы в виду стоимости процессов и отсутствия грамотных операторов, различного рода новые биотехнологические разработки целесообразно использовать для совершенствования (улучшения) уже существующих традиционных микробиологических процессов.

Основными примерами твердофазной ферментации являются многие типы обработки ряда пищевых продуктов, применяющиеся в странах Востока. В этих процессах некоторые мягкие материалы (горох, бобы, отруби и т. п.) служат объектами микробной переработки (гидролиз крахмала и белков) с целью получения продуктов улучшенного качества (например, улучшение аромата продукта, обогащение его белком и аминокислотами). Примерами традиционной пищи на Востоке являются мисо, соевый соус и др., обычно изготавливаемые в "домашних" масштабах. Однако многие из этих блюд составляют основу крупных промышленных производств, требующих существенного биотехнологического оснащения. Подобные блюда и ароматизированные соусы медленно, но верно, распространяются на Запад и несомненно станут в недалеком будущем составной частью нашего ежедневного меню.

Одноклеточный белок из сельскохозяйственного сырья

Выше было показано, каким образом микроорганизмы могут использоваться для получения одноклеточного белка из органических отходов типа сахаров, крахмала и целлюлозы. Почему же в таком случае не выращиваются растения специально для применения в качестве субстрата, на котором можно было бы получать одноклеточный белок микробиологическим способом? Концепция производства растительной биомассы в качестве материала для биотехнологических процессов крайне актуальна и важна. В настоящее время такого рода программы используются в большей степени для производства этанола, но вполне обоснованно

полагать, что маниока, сахарный тростник и некоторые виды пальм могут явиться перспективным сырьем, которое подвержено быстрым ферментативным обработкам с достаточно высоким экономическим эффектом. Если лигноцеллюлоза окажется способной легко и экономически выгодно утилизироваться какими-нибудь микроорганизмами, то большинство районов мира получат готовые питательные субстраты, пригодные для различных биотехнологических процессов.

Одноклеточный белок из водорослей

Одно время существовал повышенный интерес к проблеме использования водорослей в качестве одноклеточного белка, поскольку они хорошо растут в открытых прудах и нуждаются только в CO_2 как источнике углерода, а также в солнечном свете как источнике энергии для фотосинтеза. Такие водоросли, как *Chlorella* и *Scenedesmus*, долгое время использовались в пищу в Японии, а *Spirulina* широко применялась в Африке и Мексике. В некоторых странах мира водоросли выращивают в прудах или лагунах для удаления с их помощью ряда органических загрязнений, а образующуюся массу собирают, высушивают и добавляют в порошкообразном виде в корм животным.

Экономические аспекты применения одноклеточного белка

Экономическая целесообразность одноклеточного белка определяется его конкурентной способностью по сравнению с существующими продуктами. Препараты микробного белка богаты данным веществом и могут длительное время храниться и транспортироваться на дальние расстояния. Применение одноклеточного белка предполагается в будущем преимущественно в качестве кормовых добавок в пищу животным в целях замены других белковых материалов (таких, как соевая мука или рыбная мука). Несмотря на то что производство одноклеточного белка даже в промышленных масштабах является биологическим процессом, его внедрение не должно нарушать установившиеся в природе экологические равновесия (балансы). С этой целью в биотехнологии его получения устраняется вероятность появления каких-либо синтетических соединений и применяются (по возможности) технологии, основанные на использовании систем рециклизации, для предотвращения загрязнения окружающей среды.

Процессы получения одноклеточного белка обычно весьма объемны и энергетически очень емки и кроме того должны осуществляться в стерильных условиях, что требует дорогого оснащения, которое должно чиститься и подвергаться стерилизации. Обязательным условием является предотвращение попадания в конечный продукт посторонней микрофлоры, особенно патогенной для человека. Для того чтобы производство одноклеточного белка было экономически выгодным, масштабы его должны достигать по крайней мере 50 000 т в год готового продукта. А это, в свою очередь, требует наличия соответствующего обеспечения сырьевым материалом, который желательно иметь поблизости от основного производства. Довольно большие потребности в воде, которая нужна также для процессов завершающей обработки продукта и охлаждения.

Широкомасштабные процессы, разрабатываемые для производства одноклеточного белка, в значительной степени зависят от успехов современной биотехнологии. Поэтому в его производстве участвуют на разных этапах специалисты в области микробиологии, биохимии, генетики, химии и химической инженерии, пищевой технологии, сельского хозяйства, животноводства, экологии и токсикологии, медицины, ветеринарии и конечно экономики.

Заключение

Нет никаких сомнений, что существенные импульсы развитию производства одноклеточного белка будут поступать из ужесточающегося законодательства, связанного с увеличением объема плотных и жидких отходов, загрязняющих внешнюю среду (т. е. из требований охраны окружающей среды). Кроме того, постоянно должна повышаться конкурентоспособность одноклеточного белка, будущее которого в значительной мере зависит от снижения производственных затрат и, конечно, улучшения качества. Последнее может достигаться за счет использования более дешевых сырьевых материалов, совершенствования ферментационных процессов и завершающих стадий обработки получаемого продукта, а также повышения активности продуцентов.

6. ФЕРМЕНТНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

Энзимы (ферменты) – биокатализаторы белковой природы, для которых каталитическая функция является основной. Хотя ферменты образуются только в живых клетках, многие из них могут быть выделены из клеток без потери активности и способны работать в условиях *in vitro*.

Ферментная технология включает продукцию, выделение, очистку, использование в растворенной форме и, наконец, применение в иммобилизованном виде ферментов в широком круге реакторных систем.

Ферментная технология, вне всякого сомнения, обеспечит в будущем разрешение наиболее насущных проблем, стоящих перед обществом; например, обеспечением пищей, источниками энергии (ее сохранением и использованием с максимальной эффективностью), а также улучшением окружающей среды.

Эта новая технология происходит из биохимии, но в значительной степени из микробиологии, химии и инженерных отраслей. В будущем, надо полагать, ферментная технология в сочетании с генетической инженерией обеспечит существенный прогресс во многих областях биотехнологии.

Применение ферментов

С давних пор в таких процессах, как пивоварение, изготовление хлеба и производство сыра, использовалась (хотя и не понимаемая) деятельность ферментов. В результате эмпирических совершенствований эти традиционные технологии получили широкое распространение задолго до того момента, когда сформировались научные знания о механизмах этих процессов.

На Западе понимание промышленного значения ферментов складывалось в процессе использования дрожжей и солода с тех времен, когда традиционное пивоварение и выпечка хлеба занимало существенную долю производства. На Востоке аналогичными процессами были производство саке и разнообразные пищевые ферментации, использующие нитевидные грибы в качестве источника ферментативной активности.

1896 г. считается достоверным началом современной микробной ферментной технологии с получением первого коммерческого продукта новой отрасли – такадиастазы, представляющей собой грубую (неочищенную) смесь гидролитического фермента, приготавливаемую путем выращивания гриба *Aspergillus oryzae* на отрубях ячменя. Быстрое развитие ферментной технологии началось с середины 50-х годов на основе использования грибных (микробных) ферментов.

Причиной этого главным образом явилось следующее:

1) Интенсивное развитие практики глубинного культивирования микроорганизмов, связанных с производством антибиотиков, что, в свою очередь, потребовало новых знаний и привело к быстрому внедрению появляющихся разработок в производство.

2) Быстрое развитие основных знаний о свойствах ферментов, обуславливающее реализацию их потенциала для целей промышленного

катализа.

Свободные от клеток ферменты имеют в настоящее время широкое применение во многих химических процессах, в которых участвует большое количество последовательных реакций. Однако ферментные процессы, в которых используются в качестве катализаторов микробные клетки, характеризуются довольно большим числом ограничений:

1. Большая часть субстрата в обычных условиях превращается в микробную биомассу.

2. Наличие (или возможное появление) побочных реакций, приводящих к накоплению значительных количеств отходов.

3. Условия для роста микроорганизма могут быть иными, нежели для образования и накопления необходимого продукта.

4. Выделение и очистка необходимого продукта из культуральной жидкости могут быть сопряжены со значительными трудностями. Многие (если не все) из этих перечисленных недостатков могут быть существенно уменьшены путем использования чистых ферментов и, по-видимому, при дальнейших совершенствованиях методов применения ферментов они будут практически решены. В будущем многие традиционные ферментные процессы могут быть заменены использованием многоферментных реакторов, которые способны обеспечить высокоэффективную утилизацию субстратов, обусловить более высокий выход и намного лучшую однородность получаемых продуктов.

Большинство ферментов, используемых в промышленности, являются внеклеточными ферментами, т. е. ферментами, секретлируемыми микроорганизмами во внешнюю среду. Таким образом, если микроорганизм продуцирует ферменты для расщепления больших молекул до ассимилируемых (низкомолекулярных) форм, то ферменты обычно экскретируются в окружающую (культуральную) среду. В таких случаях культуральная (ферментационная) жидкость, получаемая при выращивании микроорганизмов (например, дрожжей или мицелиальных грибов, бактерий), является основным источником протеаз, амилаз и в несколько меньшей степени целлюлаз, липаз и других гидролитических ферментов. Многие промышленные ферменты, являясь гидролазами, могут функционировать без дополнительных сложных кофакторов; они легко выделяются (сепарируются от биомассы) без разрушения клеточных стенок продуцентов и хорошо растворимы в воде. Но поскольку большинство ферментов микроорганизмов по своей природе являются внутриклеточными, то наибольший прогресс в биотехнологии может ожидать именно при их использовании для промышленных целей.

Однако в этом случае возникает необходимость разработки эффективных способов их выделения и очистки.

Индустриальный рынок ферментов до **1965** г. был сравнительно небольшим, когда ферменты начали широко использоваться для изготовления различного рода детергентов. В последующие несколько лет

промышленное производство ферментов резко возросло. Естественно, увеличивается и мощность производств, выпускающих ферменты и для других целей, например гидролиза крахмала, изомеризации глюкозы во фруктозу, изготовления молочных продуктов (в том числе сыров) (табл. 2, рис. 51). Многие ферменты, такие, как протеазы, амилазы, глюкозоизомеразы, производятся десятками тонн, на сумму около 1 млрд. долларов.

Новые технологии, такие, как технология рекомбинантных ДНК, а также улучшение методов ферментации и последующей обработки целевых продуктов ("процессинга"), несомненно значительно снизят затраты производства (и в первую очередь стоимость ферментных препаратов), сделав их более конкурентоспособными в сравнении с химическими препаратами.

Среди многих новых областей и возможностей ферментной технологии существенное место отводится утилизации лигноцеллюлозы (или просто древесных материалов). Это "обильное" (с избытком имеющееся в природе) сырье должно использоваться человеком, и многие исследовательские разработки направлены на создание эффективных способов деструкции данного сложного органического соединения. Если это удастся осуществить, то биотехнологию ожидает блестящее будущее.

Таблица 2. – Некоторые ферменты и области их применения

Фермент	Применение
α-Амилаза	Пивоварение, производство спирта
Аминоацилаза	Получение L-аминокислот
Бромеллаин	Размягчение мяса, осветление соков
Каталаза	Антиоксидант в готовых к употреблению пищевых продуктах
Целлюлаза	Получение спирта и глюкозы
Фишин	Размягчение мяса, осветление соков
Глюкоамилаза	Пивоварение, производство спирта
Глюкозоизомераза	Производство сиропов с высоким содержанием фруктозы
Глюкозооксидаза	Антиоксидант в готовых к употреблению пищевых продуктах
Инвертаза	Инверсия сахарозы
Лактаза	Утилизация сыворотки, гидролиз лактозы
Липаза	Сыроварение, получение ароматизаторов
Папанн	Размягчение мяса, осветление соков
Пектиназа	Осветление соков, производство спирта
Протеаза	Детергент, производство спирта
Реннин	Сыроварение

Технология производства ферментов

Несмотря на то, что многие весьма полезные и ценные ферменты продуцируются клетками животных и растений, все же предполагается, что большая часть промышленных разработок в области ферментной технологии будет основываться на ферментах, получаемых из микроорганизмов. Даже в

солодовом процессе при пивоварении, где используется амилаза, получаемая из проростков ячменя, относительно недорогая, и на основании которой строится повсеместное приготовление пива, по-видимому, не выдержит конкуренции с все увеличивающимся внедрением в эти процессы бактериальных ферментов аналогичного действия.

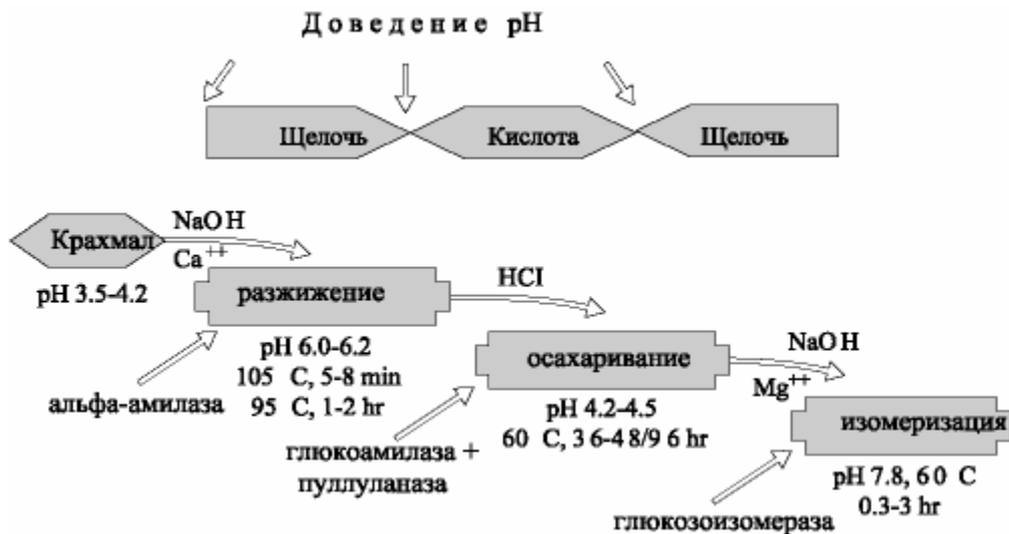


Рисунок 44. - Крупномасштабный процесс производства фруктозных сиропов из кукурузного крахмала

Типичное предприятие в день перерабатывает около 500 т зерна. Отделенные из зерен гранулы крахмала рессуспандируются в воде до концентрации 40% при pH 3,5–4,2. На стадии разжижения добавляется альфаамилаза и крахмал желируется при pH 6,2–6,5 при прямом нагревании раствора паром.

Начальная температура 105–107 °С поддерживается 5–8 минут, затем резко охлаждается до 95 °С и выдерживается 1–2 часа для дальнейшего гидролиза крахмала до размера олигосахаридов в 10–13 глюкозных остатков. Для осахаривания раствор разбавляют до концентрации 32–34% сухого вещества, pH доводят до значения 4,2–4,5, и глюкоза образуется при добавлении глюкаамилазы и пуллаланазы. Реакция проходит в реакторах при температуре 60 °С. Для изомеризации 95,5% раствор глюкозы доводят до pH 7–8 и пропускают через колонну с иммобилизованной глюкоизомеразой. Температура и скорость потока контролируются так, чтобы обеспечить на выходе примерно 42% фруктозный сироп. Высокоочищенная (90%) фруктоза получается путем хроматографического разделения моносахаров.

Использование микроорганизмов в качестве источников производства ферментов стимулируется следующими основными факторами:

- высокой степенью специфической активности в пересчете на единицу сухого веса продукта;
- сезонными колебаниями количества и качества сырьевых материалов и возможностью их длительного сохранения в зависимости от климатических изменений;
- возможностью выбора нужного фермента из широкого спектра

микробных катализаторов, характеризующихся различной степенью устойчивости к повышенным температурам рН среды;

- возможностями промышленной генетики оптимизировать количества выхода ферментов и способов селекции штаммов-продуцентов путем мутагенеза, изменения условий культивирования, а также (в последнее время) применения практически неограниченных возможностей методов генетической инженерии.

Приемы селекции различных микроорганизмов довольно сложны и включают многие факторы, такие, как стоимость культивирования, способность секретировать фермент во внешнюю среду или накапливать его внутри клетки, а также способность противостоять неблагоприятным воздействиям внешней среды, повреждающим ферменты, и т. п. В зависимости от происхождения ферменты существенно различаются между собой по термостабильности и по отношению к экстремальным значениям рН. Так, например, протеазы *Bac. subtilis* относительно стабильны при нагреваниях и активны в щелочной среде, в силу чего считаются более подходящими для использования в качестве добавок в стиральные порошки и моющие средства. В противоположность этому, грибные амилазы, вследствие их высокой чувствительности к нагреванию, пригодны в хлебопечении и т. д.

При селекции продуцентов ферментов генетики промышленных микроорганизмов стремятся улучшить желаемые их свойства: высокий выход фермента, стабильность фермента, независимость синтеза фермента от индуктора, легкое его извлечение из среды и т. п., тогда как нежелательные качества стараются устранить или ингибировать. К числу последних относятся наличие вредных побочных метаболитов, неприятный запах, нежелательный цвет препарата и т. п. Сложная генетическая техника, однако, еще не нашла широкого применения и большинство производств использует главным образом приемы мутагенеза в сочетании с хорошо отработанными селекционными методами. Общим недостатком большинства промышленных микроорганизмов является их малая генетическая изученность, что, естественно, снижает возможности улучшения полезных свойств продуцентов ферментов за относительно короткий период времени.

Однако технология переноса генов вместе с белковой инженерией способны изменить эту ситуацию и обусловить развитие новых направлений в области ферментной технологии.

Поскольку микробные ферменты являются малообъемными препаратами относительно невысокой стоимости, методы, применяемые для их производства, обычно осуществляются с использованием биореакторов (ферментеров), аналогичных по конструкции и функциям таковым, которые применяются при производстве антибиотиков. Выбор культуральной среды является весьма важным моментом в процессе производства, так как она обеспечивает растущий микроорганизм энергией, а также является источником необходимых элементов (углерода, азота и т. д.). Стоимость сырьевого материала непосредственно связана с ценой конечного продукта.

В большинстве случаев ферменты получают при ферментации с одноразовой загрузкой, длящейся от 30 до 150 часов; процессы, основанные на непрерывном (проточном) культивировании, нашли пока еще малое применение в промышленном производстве ферментов.

В процессе выращивания продуцентов ферментов, последние могут накапливаться внутри клеток или же секретироваться во внешнюю среду.

Коммерческие препараты ферментов могут выпускаться в продажу либо в жидкой, либо в кристаллической форме; очищенными или же в виде "грубых" препаратов. Например, в препаратах, используемых для гидролиза крахмала, целлюлозы, основным критерием является высокая активность основного фермента в препарате, а наличие других активностей зачастую не принимают во внимание. В то же время в препаратах ферментов, используемых в молекулярной биологии, медицине, основным критерием качества является отсутствие дополнительных ферментативных активностей и просто белковых загрязнений.

Концентрирование и очистка ферментов зачастую представляет собой весьма сложные процессы. И естественно, что стоимость препаратов ферментов зависит от всех перечисленных выше моментов.

Ферментные препараты, предназначенные для использования в пищевой промышленности или в медицинской практике, подлежат строгому контролю на токсичность для животных, мутагенную активность, тератогенность и канцерогенность, а также проверяются в различных фармакологических тестах.

Ответственность за безопасность выпускаемых ферментных препаратов ложится на фирму, их производящую. Практически, безопасный ферментный препарат должен обладать низкими аллергическими свойствами и быть свободным от токсических веществ, а также вредоносных микроорганизмов.

7. ТРЕБОВАНИЯ К ПИТАТЕЛЬНЫМ СУБСТРАТАМ

В технико-экономических показателях биотехнологических процессов определяющее значение имеют удельные затраты и стоимость сырья и энергозатраты.

Важнейший вопрос при разработке новых технологий – доступность сырьевой базы. Доступность сырья подразумевает наличие резервных вариантов, позволяющих оперативно заменять и использовать различные источники сырья без существенного изменения качества получаемого продукта.

Если процесс крупномасштабный, то доступность субстрата для культивирования (наличие его в требуемых количествах, стабильность, восполняемость, легкость в обращении и сохранении) особенно важна.

Стоимость материалов является важным фактором, поскольку внедрение любого биотехнологического процесса в значительной степени зависит от его стоимости по сравнению с существующими методами производства этого же продукта.

Микробиологическая промышленность сталкивается с исчерпанием традиционных источников сырья, необходимо расширение сырьевой базы за счет нетрадиционных источников – метанола, метана, природного газа, отходов производств.

В современных промышленных процессах используют:

- «чистое» сырье постоянного химического состава,
- комплексные соединения, в т.ч. отходы различных производств.

Использование отходов:

- наиболее выгодно экономически;
- имеет огромное значение для охраны окружающей среды.

В биотехнологических процессах на основе использования микроорганизмов (они способны усваивать различные углеродсодержащие субстраты), сырьевые источники которые принято подразделять на несколько поколений:

1-е поколение – углеводы;

2-е поколение – жидкие углеводороды;

3-е поколение – оксидаты углеводородов, газообразные углеводороды

Биотехнология на современном этапе преимущественно ориентируется на различные виды недорогого, легкодоступного и возобновляемого сырья, наиболее значимым из которого является растительная масса. При конверсии субстратов в биотехнологических процессах основное внимание обращается на создание безотходных производств, когда побочные продукты одного процесса служат питательными субстратами для последующего.

В настоящее время наиболее широко используемыми и коммерчески выгодными материалами являются крахмал (преимущественно кукурузный),

метанол, меласса и сырой сахар. Практически нет сомнения в том, что зерновые (в частности, кукуруза, рис и пшеница) будут основными краткосрочными сырьевыми материалами для биотехнологических процессов именно в тех странах, где развиты интенсивные биотехнологические процессы.

Приготовление питательных сред для ферментационных процессов является краеугольным камнем, обеспечивающим успех всех последующих этапов.

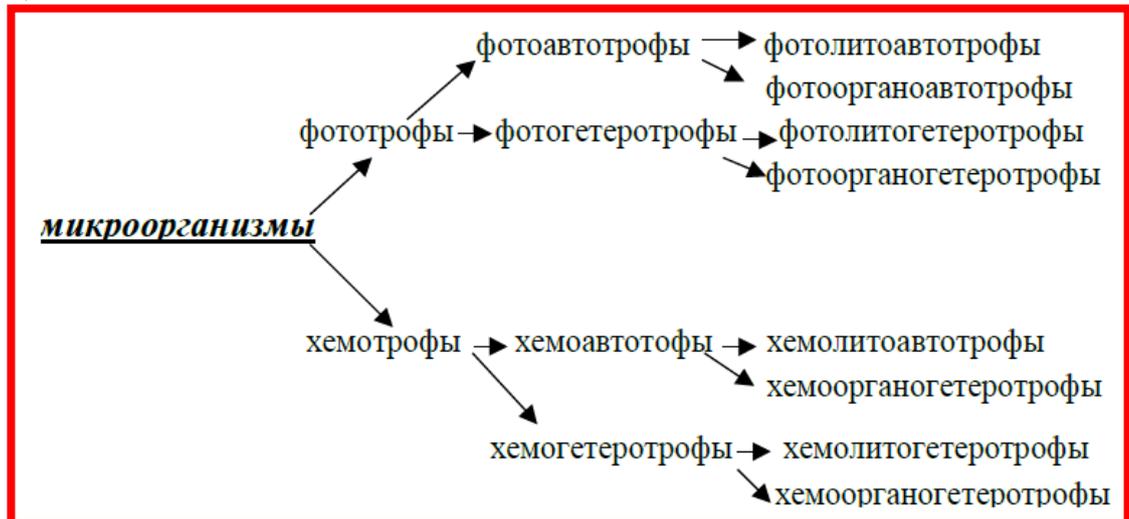
Среды неподходящего состава вызовут низкую скорость роста и, следовательно, низкий уровень выхода целевого продукта.

Требования к питательным средам в биотехнологии не отличаются от требований, предъявляемым к питательным средам, применяемым в микробиологии или же в культивировании клеток животных.

Требования к питательным средам для культивирования бактерий:

1. Среды должны содержать все необходимые питательные вещества.
2. Изотоничность – содержать набор солей для поддержания осмотического давления, определенную концентрацию NaCl.
3. Оптимальный pH среды – для большинства бактерий составляет 7,2-7,6.
4. Оптимальное содержание растворенного кислорода (для аэробов и анаэробов).
5. Прозрачность
6. Стерильность.

Компонентный состав сред определяется питательными потребностями продуцента.



В зависимости от источников углерода все микроорганизмы разделяются на:

Автотрофы (от греч. autos – сам, trophe – пища, питание) – микроорганизмы, способные усваивать или фиксировать CO₂ воздуха в качестве единственного источника углерода и синтезировать из нее органические вещества клеток.

Гетеротрофы – нуждающиеся в готовых органических веществах.

Гетеротрофы, в свою очередь, разделяются на *сапрофитов* (метатрофов), живущих за счет органических соединений, поступающих в бактериальную клетку из внешней среды и *паразитов* (паратрофов), способных утилизировать только продукты метаболизма внутри живой клетки.

Многие бактерии нуждаются в факторах роста (витамины, основания нуклеиновых кислот и другие биологически активные вещества). По этому признаку выделяют: ауксотрофы, для которых в среде необходимо наличие одного или нескольких факторов роста и прототрофы, они в факторах роста не нуждаются.

Итак, в питательной среде должны присутствовать источники С и N в определенных соотношениях, а также другие необходимые элементы

Автотрофы и гетеротрофы в зависимости от используемого источника энергии делятся на:

- *фототрофы* используют энергию света и трансформируют ее в химическую,

- *хемотрофы* – энергию, освобождаемую в реакциях окисления-восстановления.

Все окислительно-восстановительные реакции энергетического метаболизма у хемотрофных микроорганизмов можно разделить на три типа:

- аэробное дыхание или аэробное окисление;
- анаэробное дыхание;
- брожение.

В зависимости от того, какие вещества – органические или неорганические – являются донорами электронов, все микроорганизмы также подразделяют на две группы. *Органотрофы* – организмы, использующие в качестве доноров электронов органические вещества и *литотрофы*, способные использовать в качестве доноров электронов неорганические (H_2 , NH_3 , H_2S , CO , Fe^{2+} и т. д.).

Питательные среды для продуцентов:

- неопределенного химического состава с различными биогенными добавками (растительными, животными – мясным экстрактом, кукурузной мукой, морскими водорослями и т. п.);

- синтетические (из чистых химических соединений определенного состава).

Классификация питательных сред по происхождению:

- естественные (молоко, желатин, картофель и др.);
- искусственные (из специально подготовленных природных компонентов: пептона, аминокептида, дрожжевого экстракта и т. п.);
- синтетические – среды известного состава, из химически чистых соединений (солей, аминокислот, углеводов и т. д.).

Все типы сред имеют и преимущества и недостатки:

- экономически более выгодно использование природного более

дешевого сырья;

- только среды строго определенного состава позволяют регистрировать и регулировать процессы, происходящие в биореакторе, добиваться их оптимизации.

Компромиссный подход – полусинтетические среды.

Классификация питательных сред по составу:

- простые – мясопептонный агар, мясопептонный бульон, агар Хоттингера и др.;

- сложные – среды с добавлением дополнительного питательного компонента: сахарный бульон, желчный бульон, сывороточный агар, кровяной агар и др.

H₂O:

- водопроводная, из артезиан-ских скажин, открытых водоемов (после соответствующей обработки);

- биологически чистая, без привкуса и запаха, без осадка;

- сухой остаток – ≤ 1 г/л, жесткость ≤ 7 мг-эquiv/л (но дрожжи)

Требования к H₂O:

- количество сапрофитных микроорганизмов ≥ 1000 колоний/мл;

- кишечная палочка – 1/300 мл – недопустимо!!!

Окислители (на 1 л), мг	Не более 5
Общая жесткость, мг-эquiv/л	до 8
Хлориды, мг	Не более 50
Сульфаты, мг	До 60
Аммиак, °	До 20
Железо	Следы
Азотная кислота, мг	До 40
Реакция	Нейтральная

H₂O:

(мг/л) \leq

- Pb – 0,1;

- As – 0,05;

- F – 1,5;

- Zn – 5,0;

- Cu – 3,0

В производстве используют для приготовления сред:

кислота соляная - $\geq 31\%$;

- мочевины

- сульфат аммония

- фосфат аммония - As $\leq 0,005$, F $\leq 0,3\%$;

- хлорид калия – NaCl $\leq 1,4\%$;

- карбонат калия

- сульфат магния

- едкий натрий

- карбонат натрия
- CaCO_3 (мел) – $\text{HCl} \leq 5\%$;
- NH_4OH – $\geq 25\text{-}20\%$ азота

При получении энзимных препаратов с позиций экономических и хозяйственных требований сырьем может быть лишь тот материал, который

- легко доступен,
- может быть получен в большом количестве,
- имеет высокую концентрацию целевого энзима.

Источники азота

Азот может содержаться в форме неорганических солей или кислот. Большинство дрожжей хорошо усваивает аммиачные соли, а также аммиак из водного раствора, потребность в нитратах испытывают только некоторые виды дрожжей. Источником азота могут служить и органические соединения: аминокислоты, мочевины и т.д., которые легко усваиваются микроорганизмами. Известно, что бактерии более требовательны к источникам азота, чем другие микроорганизмы (грибы, актиномицеты и дрожжи).

Источники фосфора

Фосфор является важнейшим компонентом клетки. Он входит в состав АТФ (аденозинтрифосфата), АДФ, АМФ и тем самым обеспечивает нормальное течение энергетического обмена в клетке, а также синтез белков, нуклеиновых кислот и другие процессы биосинтеза. Фосфор вносят в среду в виде солей фосфорной кислоты.

Источники витаминов и микроэлементов

Потребность микроорганизмов в этих соединениях различна, тем не менее, практически все микроорганизмы лучше растут в присутствии витаминов. Эффективной добавкой к питательным средам оказался кукурузный экстракт благодаря наличию в нем витаминов, аминокислот и минеральных элементов в легко усваиваемых формах. В рецептуры сред включают также дрожжевой автолизат, дрожжевой экстракт, сок картофеля, молочную сыворотку, экстракт солодовых ростков и другие продукты. Микроэлементы в состав питательных сред вводят в микродозах, в противном случае они оказывают ингибирующее действие на микробные клетки. При составлении питательной среды для конкретного вида микроорганизма подбираются наиболее подходящие источники углерода, азота, фосфора и других веществ.

При работе на культурах животных клеток выбор среды особенно важен, но носит часто эмпирический характер (подбор), поскольку не всегда известно какие факторы питания клетки способствуют максимальному уровню целевого результата

Во многих случаях, особенно при получении продуктов жизнедеятельности таких клеток важны условия, позволяющие вести культивирование в химически детерминированных условиях и обходиться без сыворотки крови животных или при ее дефиците в среде

Вот примеры решения питательных сред с дефицитом сыворотки крови:

Патент ВУ № 8301

Способ культивирования нервной ткани и нервных клеток млекопитающих, включающий использование синтетической питательной среды с добавлением фетальной телячьей сыворотки, отличающийся тем, что фетальную телячью сыворотку добавляют до концентрации 0,05% (!!!) и дополнительно в среду добавляют плазминоген до концентрации (10⁻⁸-10⁻⁷) М.

Патент ВУ № 12585

Способ культивирования перевиваемой клеточной линии нейробластомы IMR-32 в синтетической питательной среде, содержащей биологически активное соединение, в атмосфере с 5%-ным содержанием CO₂ при 37 °С и 90%-ной влажности, отличающийся тем, что в качестве биологически активного соединения среда содержит пируваткиназу в концентрации 10⁻¹¹-10⁻⁷ М.

Патент ВУ № 16397

Способ защиты первичной или перевиваемой культуры клеток нервной ткани от дегидратации в гипертонической среде, представляющей собой питательную среду DMEM с 2% NaCl, заключающийся в том, что используют гипертоническую среду, содержащую стрептокиназу в концентрации 20-2000 МЕ/мл

Патент ВУ № 20514

Способ активации дифференцировки юных нейронов спинного мозга млекопитающего в культуре в условиях дефицита белков сыворотки крови в питательной среде, заключающийся в том, что клетки и ткани спинного мозга культивируют в синтетической питательной среде DMEM, а затем добавляют в питательную среду глицин в концентрации 0,75-7,50 мг/мл

Отсутствие сыворотки крови в питательной среде для культур животных клеток может быть важным, поскольку это облегчает выделение из среды продуктов жизнедеятельности

Субстраты для культивирования биообъектов

Питательные среды для выращивания объектов биотехнологии, т. е. продуцентов тех или иных соединений, могут быть неопределенного состава и включать различные биогенные добавки (растительные, животные или микробные) – мясной экстракт, кукурузную муку, морские водоросли и т. п. Применяются также среды из чистых химических соединений определенного состава, так называемые синтетические.

Компонентный состав сред определяется питательными потребностями продуцента. Во многих процессах используют в качестве объектов организмы, ранее называвшиеся гетеротрофами, которые в настоящее время подразделяются на: органы автотрофы (употребляющие органические вещества как источники энергии), литогетеротрофы (использующие

органические вещества как источники углерода) и органогетеротрофы (для которых органические вещества служат и источниками энергии, и источниками углерода).

Питательные среды призваны обеспечивать жизнеспособность, рост и развитие соответствующих продуцентов, а также синтез целевого продукта с максимальной эффективностью. Требования к питательным средам, используемым в биотехнологии, ничем не отличаются от требований, предъявляемым к питательным средам, применяемым в микробиологии для культивирования тех или иных микроорганизмов. Для приготовления питательных сред в биотехнологии используются разнообразные субстраты, которые должны удовлетворять определенным критериям.

Субстрат представляет собой сырье для получения целевого продукта и должен быть недефицитным, дешевым, по возможности легко доступным.

Растительная биомасса и (в меньшей степени) биомасса животных организмов представляют собой достаточно хорошо утилизируемые источники углерода для биотехнологических целей. На основе этих источников основано давно существующее производство алкоголя из зерна и сыра из молока. Растительные источники могут рассматриваться как практически неистощимые. Первичная продукция фотосинтеза (рост растений за счет использования солнечной энергии) на земле обеспечивает 2×10^{11} т вещества (биомассы) в год в пересчете на сухой вес!

Наибольшая доля биомассы (около 44 %) образуется в виде древесины. Вызывает удивление факт, что продукция сельского хозяйства составляет лишь 6 % первичной продукции за счет фотосинтеза, хотя именно из этого количества получается основная часть пищи для людей и животных, а также многие необходимые материалы (например, для текстильной и бумажной промышленности).

В будущем значительная часть традиционных сельскохозяйственных продуктов сможет производиться с использованием современной биотехнологии. В частности, новые биотехнологические подходы позволят обеспечить утилизацию большого количества отходов сельского хозяйства, которые в настоящее время не находят применения, и использовать их для приготовления питательных продуктов.

Биомасса сельского и лесного хозяйства в настоящее время является значительным экономическим потенциалом во многих национальных экономиках, в первую очередь в тропических и субтропических регионах.

Побочные продукты – биотехнологическое сырье

Одной из главных задач биотехнологии является максимальное использование огромных объемов органических отходов, повсеместно образующихся в мировом производстве. Биотехнологическая утилизация этих отходов, во-первых, обеспечит удаление источников загрязнения (например, сточных вод), а во-вторых, обусловит превращение этих отходов в полезные целевые продукты. Продукты отходов играют важную роль в экономике и в состоянии окружающей среды. Так, многие побочные

материалы пищевой промышленности оказываются экономически малозначащими и часто выбрасываются в магистральные водные системы, обуславливая мощное загрязнение внешней среды.

Поэтому кажется весьма привлекательным разработать технологии их утилизации в качестве биотехнологического сырья, с извлечением двойной выгоды.

Каждый загрязняющий материал должен быть оценен относительно его пригодности для биотехнологических процессов. Только в том случае, когда продукт отхода имеется в больших количествах и образуется в течение длительного периода (т. е. при масштабном производстве), он может рассматриваться в качестве подходящего сырья для утилизации.

Двумя широко распространенными видами отходов, которые нашли уже сейчас применение в биотехнологических процессах в качестве сырья для ферментации, являются меласса (черная патока) и молочная сыворотка. Меласса представляет собой побочный продукт, появляющийся при производстве сахара, и содержит до 50% сахаров.

Меласса широко используется как питательный субстрат для ферментационных процессов в производстве антибиотиков, органических кислот и коммерческих дрожжей для хлебопечения; помимо этого, она используется в чистом виде в качестве добавки в корма животным.

Ситуация в данный момент такова, что спрос на мелассу значительно превышает имеющиеся ресурсы. Сыворотка, получаемая при производстве сыра, также может быть использована в качестве питательного субстрата для ферментации.

Более сложные продукты отхода, такие, как *солома и жом* (отход сахарного производства), также имеющиеся в больших количествах и во многих местах, по мере улучшения процессов расщепления лигноцеллюлозных соединений все больше находят применение в биотехнологических производствах.

Наибольшую часть продуктов отхода составляют *отбросы животноводства* (испражнения, моча), затем сельскохозяйственные отходы, отходы пищевой промышленности и, наконец, отбросы домашнего хозяйства. Утилизация многих компонентов отходов, в частности животного происхождения, не представляет серьезной проблемы при традиционном ведении сельского хозяйства. Это хорошо демонстрируется на примере Китая, где рециклизация путем компостирования отходов животноводства практикуется с давних пор. Однако при интенсивном животноводстве (особенно при широкомасштабном) возникают порой весьма трудно разрешимые осложнения.

Химические и нефтехимические субстраты

С развитием биотехнологических процессов в коммерческих масштабах для производства одноклеточного белка (SCP), а также ряда других органических продуктов многие питательные вещества химического и нефтехимического происхождения приобретают важную роль в качестве

питательных субстратов для ферментации. Их преимущество состоит в том, что они имеются в больших количествах и практически одинакового качества в различных странах мира. Например, природный газ или нефтяной газ, метанол и этанол.

Сырьевые материалы и перспективы биотехнологии

Наиболее важным критерием, определяющим выбор сырья для биотехнологических процессов, являются: стоимость, наличие в достаточных количествах, химический состав, форма и степень окисленности источника углерода и т. п. В настоящее время наиболее широко используемыми и коммерчески выгодными материалами являются крахмал (преимущественно кукурузный), метанол, меласса и сырой сахар. Практически нет сомнения в том, что зерновые (в частности, кукуруза, рис и пшеница) будут основными краткосрочными сырьевыми материалами для биотехнологических процессов именно в тех странах, где развиты интенсивные биотехнологические процессы.

В качестве резюме следует отметить, что биотехнология на современном этапе своего развития преимущественно ориентируется на различные виды недорогого, легкодоступного и возобновляемого сырья, наиболее значимым из которого является растительная масса. При конверсии субстратов в биотехнологических процессах основное внимание обращается на создание безотходных производств, когда побочные продукты одного процесса служат питательными субстратами для последующего.

8. ПРИРОДНЫЕ СЫРЬЕВЫЕ МАТЕРИАЛЫ

В биотехнологических процессах на основе использования микроорганизмов (они способны усваивать различные углеродсодержащие субстраты), сырьевые источники, которые принято подразделять на несколько поколений:

1-е поколение – углеводы;

2-е поколение – жидкие углеводороды;

3-е поколение – оксидаты углеводородов, газообразные углеводороды.

Микроорганизмы способны ассимилировать любое органическое соединение, поэтому потенциальными ресурсами для микробиологической биотехнологии могут служить все мировые запасы органических веществ, включая первичные и вторичные продукты фотосинтеза, а также запасы органических веществ в недрах Земли.

Наиболее распространенными источниками углерода при культивировании микроорганизмов являются:

- углеводы (чистые и углеводсодержащее сырье),
- спирты,
- органические кислоты,
- углеводороды.

Однако каждый конкретный вид микроорганизмов, используемый в биотехнологии, весьма избирателен к питательным веществам, и органическое сырье (кроме лактозы, сахарозы и крахмала) без предварительной химической обработки малоприспособно для микробного синтеза.

Легкодоступные сахара: глюкоза, сахароза, лактоза; затем – многоатомные спирты: глицерин, маннит и др.

Далее – *полисахариды:* целлюлоза, гемицеллюлоза, крахмал могут быть источниками углерода либо после превращения их в усвояемые микроорганизмами моно- и олигосахариды или микроорганизмы должны быть способны гидролизовать эти вещества.

К ним относятся плесневые грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium*, бактерии рода *Bacillus* и др. Большое количество микроорганизмов успешно утилизируют органические кислоты, особенно в анаэробных условиях.

Глюкоза ($C_6H_{12}O_6$) – идеальный субстрат практически для всех биотехнологических производств. Однако в чистом виде в крупнотоннажном производстве не используется из-за высокой цены.

Она входит в состав комплексного сырья в виде гидролата – отхода крахмало-паточного производства.

Сахароза ($C_{12}H_{22}O_{11}$) – не менее идеальный субстрат практически для всех биотехнологических производств. Использование крайне ограничено из-за высокой стоимости. Используется для культивирования микроорганизмов – продуцентов некоторых аминокислот, когда другие

источники сырья, содержащие сахарозу, применить невозможно.

Входит в состав (до 40%) мелассы – отхода производства сахара, приготовленных специальным образом гидролизатов растительного сырья, в т. ч. сульфитного щелока, торфа.

В качестве *источников углеродного питания* используют технические виды углеродсодержащего сырья: *мелассу, соки растений, патоку, крахмал, сульфитный щелок.*

Такие источники углерода часто представляют сложные многокомпонентные смеси и служат источниками также и других необходимых для роста культуры микроорганизмов химических элементов

Мелассу широко используют в производстве хлебопекарских дрожжей, в биосинтезе большинства L-аминокислот (глутаминовой, лизина и др.). Однако современные сахарные заводы, совершенствуя свои технологии, могут выдавать мелассу, содержащую $\leq 20-30\%$ сахара.

Такое сырье представляет меньший интерес для биотехнологии.

Свекловичная меласса – отход производства сахара из свеклы содержит 45-60 % сахарозы, 0,25-2,0% инвертного сахара, 0,2-3,0% рафинозы, аминокислоты, органические кислоты и их соли, бетаин, минеральные вещества, а также некоторые витамины. Используют для промышленного производства лимонной кислоты, этанола и др.

Зерно-картофельная барда – отход спиртового производства. Содержание растворимых сухих веществ составляет 2,5-3,0%, в том числе 0,2-0,5% редуцирующих веществ, имеются источники азота и микроэлементы. Применяется для получения микробного белка.

Отходы пивоварения (пивная дробина и солодовые ростки), а также отходы подработки несоложенного ячменя являются подходящим, однако небольшим источником усвояемых углеводов. Для производства кормовых дрожжей это сырье гидролизуют и вводят в питательную среду в соотношении 8 : 0,2 : 0,05 (дробина : ростки : отходы ячменя).

Пшеничные отруби используют для приготовления питательных сред при твердофазном способе культивирования. Имеют богатый химический состав и могут быть единственным компонентом питательной среды. Пшеничные отруби дороги, их смешивают с более дешевыми компонентами: древесными опилками, солодовыми ростками, фруктовыми выжимками и т.д.

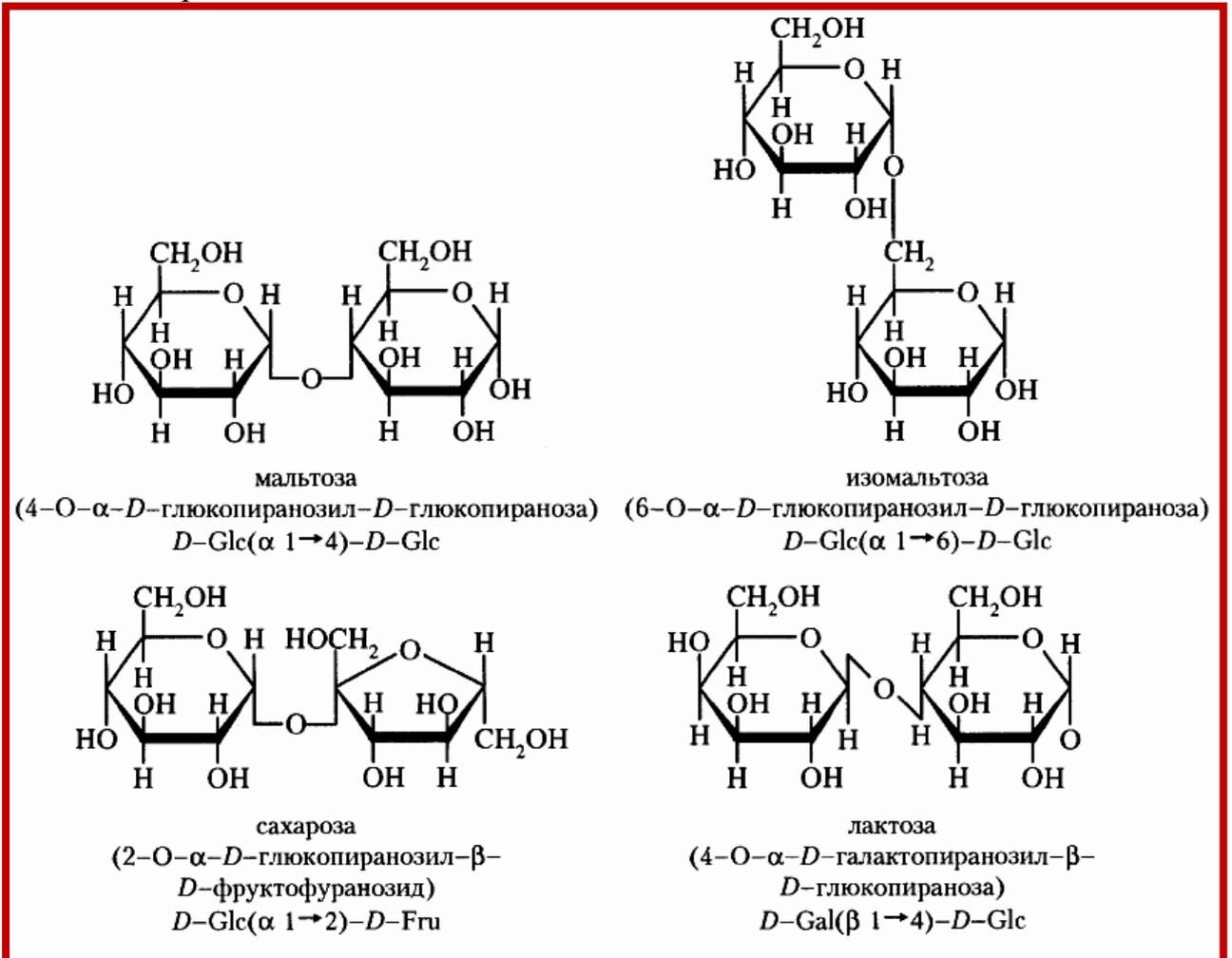
Молочная сыворотка – отход производства сыров, творога и казеина (различают подсырную, творожную и казеиновую сыворотку). По химическому составу и энергетической ценности данный продукт считают «полумолоком». Ее сухой остаток содержит 70-80% лактозы, 7-15% белков, 2-8% жира, 8-10% минеральных солей. Она имеет в своем составе значительное количество гормонов, органических кислот, витаминов и микроэлементов.

Разработаны способы получения микробных продуктов, основанные на использовании лактозы монокультурой или смесью дрожжей и бактерий. В качестве продуцентов используют дрожжи родов *Candida*, *Trichosporon*, *Torulopsis*. Молочная сыворотка с выросшими в ней дрожжами по

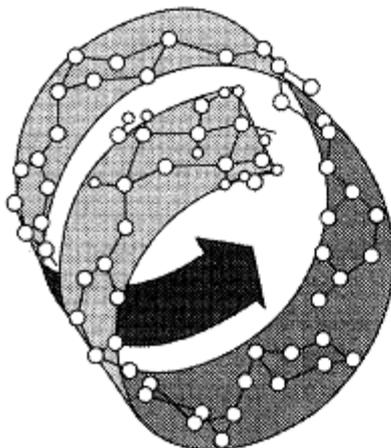
биологической ценности превосходит исходное сырье, и ее можно использовать как заменитель молока.

Крахмал (C₆H₁₀O₅)

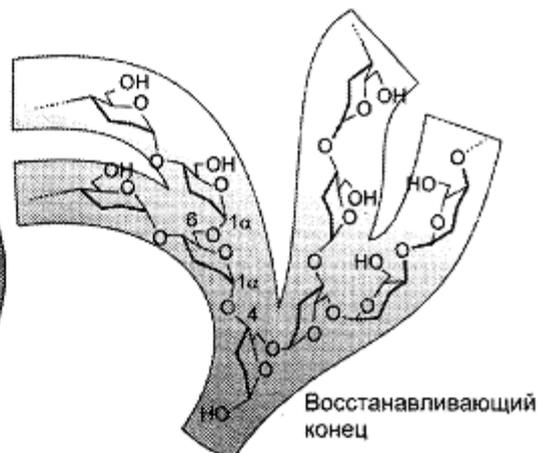
Крахмал картофельный или кукурузный – продукт пищевой промышленности. Разваренный в присутствии амилалитических энзимов, образует вязкую однородную массу, которую используют как субстрат для биосинтеза ряда биологически активных веществ.

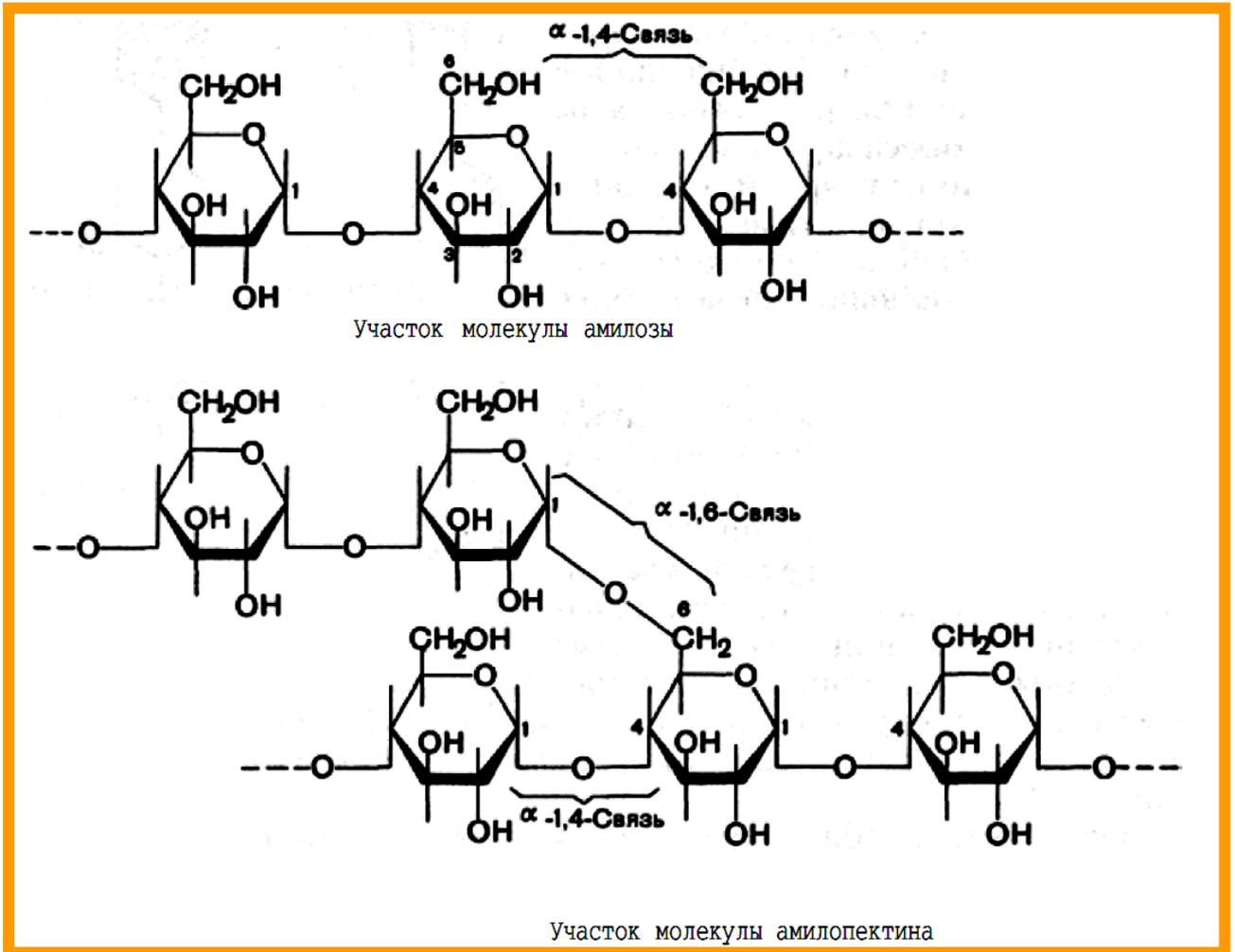


1. Амилоза 20%



2. Амилопектин 80%

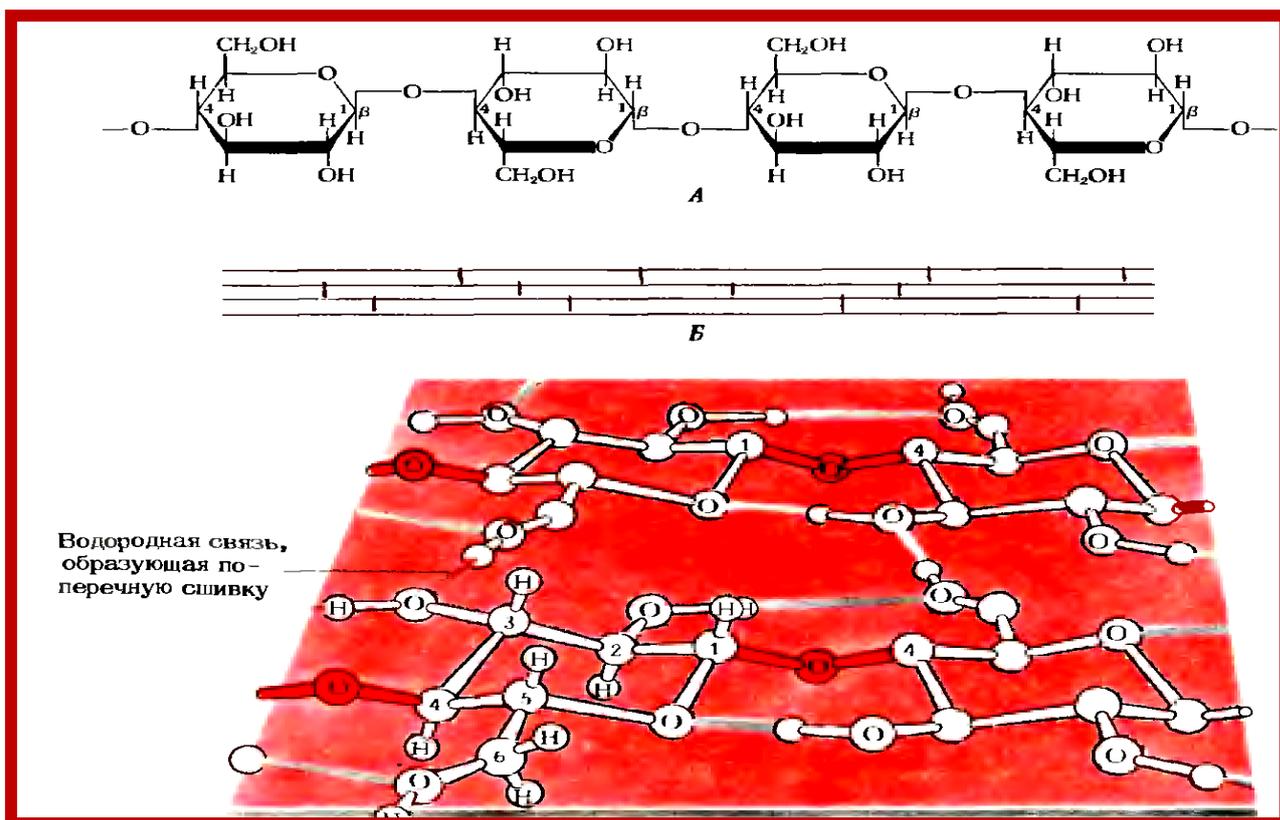




Химический состав растительного сырья неодинаков. Главной частью его являются полисахариды (целлюлоза, гемицеллюлозы, пектиновые вещества) – 40-75% и лигнин – 15–60%.

Лигнин – нерастворимый при гидролизе остаток растительного сырья – находит ограниченное применение и является балластом.

Целлюлоза составляет половину высушенной растительной биомассы – ценный источник углерода и энергии.



Гидролизаты растительного сырья – это растворы сахаров в виде смеси гексоз и пентоз, образующиеся при кислотном гидролизе древесины, подсолнечной и хлопковой шелухи, кукурузной кочерыжки, ботвы и т.п.

Основной способ гидролиза растительного сырья – перколяционный гидролиз 0,5% серной кислотой при повышенном давлении и температуре (160-170 °С) в течение 2,5 часов. При гидролизе горячая серная кислота протекает через слой неподвижной твердой фазы (измельченного растительного сырья).

Для получения биологически доброкачественных гидролизатов проводят дальнейшую обработку: нейтрализацию кислот, отделение осадков и коллоидных частиц, охлаждение до 30 °С, удаление вредных летучих примесей. Основные недостатки процесса гидролиза древесины – образование крупнотоннажного отхода – лигнина и низкое качество гидролизата с точки зрения микробиологического синтеза.

Избыток серной кислоты удаляют в виде гипса фильтрованием после нейтрализации гидролизата известковым молоком.

При этом основная примесь, подавляющая обмен веществ, рост и развитие микроорганизмов:

- фурфурол (> 0,02%);
- оксиметилфурфурол (> 0,1%).

Поэтому из гидролизатов растительного сырья сначала обязательно выделяют фурфурол. Для этого гидролизаты охлаждают до температуры 30-35°С в вакуум-охлаждающей установке. При этом летучие компоненты гидролизата конденсируются и далее в зависимости от количества фракции образовавшегося фурфурола поступают в цех по переработке летучих

соединений в товарный продукт.

В настоящее время интенсивно разрабатываются более совершенные процессы гидролиза растительного сырья.

Перспективным направлением является энзиматический гидролиз целлюлозы.

Сульфитный щелок – раствор, получаемый при сульфитной варке целлюлозы. На 1 т. произведенной целлюлозы приходится 8–10 т. щелока. Содержит (% по массе): 10-14 орг. веществ, в т.ч. 7-10 лигносульфонатов и 3-4 моносахаридов (главным образом ксилоза, галактоза, глюкоза), летучие орг. кислоты (уксусная и муравьиная в соотношении 10:1; в щелоке из хвойной древесины достигает 10-15 от содержания сахаров, из лиственной — 30-45). Из органических веществ щелока получают этанол, биоэтанол, дрожжи, антибиотики, растворители, ванилин, фенолы.

Гидрол – отход крахмалопаточного производства; сиропообразная однородная жидкость, содержащая 65–66% сухих веществ.

В их составе: 68–72% редуцирующих веществ и 5–6% золы (в т.ч. 2–3% хлористого натрия). Сбраживается около 70% редуцирующих веществ (главным образом глюкоза). Применяют в производстве питательных сред, этанола и комбинированных кормов.

Особого внимания заслуживают способы прямой биоконверсии продуктов фотосинтеза и их производных в белок с помощью грибов.

Грибы, благодаря мощным энзимным системам, способны утилизировать сложные растительные субстраты без предварительной обработки.

Процесс, основанный на выращивании целлюлозоразрушающих грибов *Chaetomium cellulolyticum*, можно осуществлять в глубинной культуре и поверхностным методом. Содержание белка в конечном продукте (высушенном грибном мицелии) составляет 45% .

В микробиологической промышленности сырье идет на производство:

- этанола – $\geq 90\%$;
- хлебопекарных дрожжей – 5%;
- антибиотиков – 1,7%;
- органических кислот и аминокислот – 1,65%.

Биотехнология энзимов является крупным потребителем крахмала: только одной фруктозной патоки производится свыше 3,5 млн. в год .

Ранее в канализацию спускали воду после замачивания кукурузных зерен при их переработке в крахмал и глюкозу. Сейчас ее упаривают, получая экстракт для микробиологической промышленности.

Используют *отходы химического производства* (смесь карбоновых кислот: янтарной, кетоглутаровой, адипиновой), а также сульфитный щелок, зерновую и картофельную барду, мелассу, гидрол.

В России ежегодно остается неиспользованной или нерационально используется около 1 млн. т. *лактозы* (в сыворотке и пахте).

В США из всего количества молочной сыворотки, образующейся при

производстве сыра (ежегодно 20 млн. т.), половина теряется со сточными водами. Из 1 т. сыворотки можно получить около 20 кг сухой биомассы дрожжей. Кроме того, из сепарированной бражки можно выделить дополнительно около 4 кг протеина.

Нерационально используется *картофельный сок*, выделяемый из картофеля при производстве крахмала, а также альбуминное молоко, получаемое из сыворотки.

Низкомолекулярные спирты: метанол и этанол – перспективные виды сырья.

Многие дрожжи родов *Candida*, *Hansenula* и др. ассимилируют этанол.

Дрожжи родов *Pichia*, *Candida* и другие, бактерии рода *Flavobacterium* используют в качестве единственного источника углерода метанол.

Некоторые виды микроорганизмов используют в качестве источника углерода и энергии углеводороды: n-алканы и некоторые фракции нефти.

Гидролизаты торфа считаются перспективным сырьем для получения кормовых дрожжей. Наибольшее значение имеет верховой торф (содержит до 50% полисахаридов). Гидролиз торфа проводят разбавленной серной кислотой (0,5-0,7%) при температуре 160-170 °С. Торф, содержащий значительное количество азота и фосфора в легкоусвояемой форме, после подготовки – хорошее сырье для производства кормовых дрожжей.

Каменный уголь, природный газ и древесина могут служить сырьем для химического синтеза технических спиртов или уксусной кислоты, а последние, в свою очередь, являются отличным сырьем для микробиологической промышленности.

В 1939 г. В. О. Таусоном была установлена способность разных видов микроорганизмов использовать в качестве единственного источника углерода и энергии n-алканы и некоторые фракции нефти.

Распространенными источниками углерода и энергии являются *компоненты нефти и природного газа*. В состав сырой нефти входят парафиновые, нафтеновые и ароматические углеводороды с большей или меньшей примесью кислородсодержащих или сернистых соединений

В наиболее распространенных сортах нефти содержится

50-60% нафтенов,

20-30% парафинов,

15-30% ароматических углеводородов.

Дизельная фракция (продукт переработки нефти) содержит не менее 15% парафинов и является источником парафиновых углеводородов, которые по структуре и молекулярной массе оптимальны для потребления бактериями и дрожжами.

Полученные жидкие парафины пригодны для культивирования микроорганизмов и имеют следующий состав (%):

- n-алканы (парафиновые углеводороды) с числом С атомов 10-20 – 98%;

- ароматические углеводороды - 0,2%

- сера - 0,05%

Нормальные (неразветвленные) парафины нефти: выход биомассы может достигать при их использо-вании до 100% от массы субстрата. При использовании парафинов достаточной степени очистки, полученная дрожжевая масса может успешно применяться в качестве дополнительного источника белка в рационах животных.

Первый в мире крупный завод кормовых дрожжей мощностью 70 000 т. в год пущен в 1973 г. в СССР. В качестве сырья на нем использовали выделенные из нефти n-алканы и несколько видов дрожжей, способных к быстрому росту на углеводородах: *Candida maltosa*, *Candida guilliermondii*, *Candida lipolytica*.

В США, Японии, Канаде, ФРГ, Великобритании разработаны технологические процессы получения белка на природном газе. Выход биомассы в этом случае может составлять 66% от массы субстрата. В разработанном в Великобритании процессе используется смешанная культура: бактерии *Methylomonas*, усваивающие метан, *Hypermicrobium* и *Pseudomonas*, усваивающие метанол, и два вида неметилотрофных бактерий. Культура характеризуется высокой скоростью роста и продуктивностью.

Субстратом для микробного синтеза может быть и CO₂. Окисленный углерод с успехом восстанавливается микроводорослями при помощи солнечной энергии и водородоокисляющими бактериями при помощи водорода. На корм скоту используют суспензию водорослей. Для работы установок по выращиванию водорослей необходимы стабильные климатические условия – постоянные температуры воздуха и инсоляция

Для получения биомассы используются, как правило, бактерии рода *Hydrogenomonas*.

В институте микробиологии Геттингенского университета (Германия) разработан способ культивирования водородоокисляющих бактерий, при котором можно получать 20 г сухого вещества на 1 л суспензии клеток.

Источником природного сырья являются сельское хозяйство и отрасли лесоводства. Получаемые в этих отраслях материалы представляют собой соединения различной химической сложности и включают сахара, крахмал, целлюлозу, гемицеллюлозу и лигнин. Из первичных сырьевых материалов в процессе производства тех или иных продуктов традиционными методами получается огромное число разнообразных побочных продуктов, которые в силу достаточно высокой питательной ценности могут использоваться в биотехнологических процессах.

Наиболее подходящим и доступным, чтобы служить питательным субстратом для биотехнологических процессов, является сырье, используемое в производстве сахара – *сахарная свекла и сахарный тростник*. Однако в настоящее время в мире традиционное использование сахара постепенно снижается, и он заменяется более эффективными подсластителями. Складывающаяся ситуация на мировом сахарном рынке будет способствовать поискам его нового применения, и многие страны тропических областей испытают существенный экономический коллапс, если

исчезнет сахарный рынок. Уже сейчас сахарный тростник используется в качестве субстрата для бразильской "топливной" программы (производство этанола как горючего для двигателей внутреннего сгорания и в первую очередь для автомобилей, поскольку они меньше загрязняют атмосферу). Бразильский пример быстро убеждает многие другие страны в перспективности такой новой технологии.

Существенную значимость представляют *крахмалосодержащие сельскохозяйственные продукты*, включающие различные злаки, такие, как кукуруза, рис, пшеница, картофель, различные корнеплоды, сладкий картофель и маниока. Некоторым недостатком крахмала является то, что до использования в качестве питательного субстрата он обычно должен быть разрушен до моносахаридов или олигосахаридов путем ферментативного переваривания или гидролиза. Тем не менее в настоящее время с определенным успехом разрабатываются перспективные биотехнологические процессы, основанные на использовании данного полисахарида.

Половину высушенной растительной массы как сельскохозяйственного, так и "лесного" происхождения составляет один из самых распространенных биополимеров – *полисахарид целлюлоза*, являющийся ценным источником энергии и углерода. Почти не вызывает ни у кого сомнения, что целлюлоза должна рассматриваться в качестве основного питательного сырья для биотехнологических процессов.

Однако необходимым условием подготовки данного материала к использованию в качестве биотехнологического сырья является ее гидролиз до простых водорастворимых сахаров (глюкозы, целлобиозы). Как ни странно, но это до сих пор представляет довольно трудную задачу.

Наибольшие сложности встречаются при попытках утилизации древесины, в которой целлюлоза находится в комплексе с гемицеллюлозой и лигнином. Лигноцеллюлозные комплексы характеризуются очень высокой степенью устойчивости к природным силам биodeградации. Именно это свойство и обуславливает долговечность деревьев и, естественно, построек из дерева, поскольку деревья состоят главным образом из лигноцеллюлозы.

Лигноцеллюлоза является наиболее распространенным и возобновляемым природным сырьем, доступным человеку практически во всех странах мира. Однако должны быть преодолены огромнейшие технологические трудности, прежде чем окажется экономически выгодным использование этого энергетически богатого соединения. В данный момент для того, чтобы сделать ее доступной для микробиологической деградации, необходимы весьма дорогие и энергоемкие процессы предварительной обработки.

Чистая целлюлоза может быть довольно легко разрушена путем химического или ферментативного гидролиза до растворимых сахаров, которые затем легко подвергаются ферментации (сбраживанию) микроорганизмами с образованием этанола, бутанола, ацетона, одноклеточного белка (SCP), метана и многих других продуктов. В этом плане разительные успехи достигнуты в США, Швеции, Британии и дело

только во времени, чтобы преодолеть вышеперечисленные трудности.

Довольно точно подсчитано, что на Земле в год фиксируется приблизительно $3,3 \times 10^{14}$ кг CO_2 и примерно 6 % этого количества, т. е. 22 биллиона т в год приходится на долю целлюлозы. В мировом масштабе земные растения продуцируют 24 т целлюлозы на человека в год. И все было бы уже давно сделано, если бы целлюлоза была без примеси лигнина. Лигнин препятствует химическому и ферментативному разрушению целлюлозы, мешая доступу к ней реагентов и активно адсорбируя гидролитические ферменты, выводя их из строя.

Сам по себе лигнин также крайне устойчив к деградационным воздействиям как химического, так и биологического характера, вследствие чего представляет серьезную проблему как загрязнитель внешней среды при производстве бумаги. Причем проблема эта в настоящий момент далека от разрешения. Причина основная сводится к сложности пространственной организации молекул этого вещества – гемицеллюлозы, основным компонентом которой является второй по распространенности растительный биополимер ксилан, состоящий из остатков ксилозы, а также небольших количеств арабинозы и глюкуроновой кислоты. Он является не только отходом при гидролизе растительного сырья, но и сам по себе может служить биотехнологическим сырьем. Химический гидролиз ксилана приводит к накоплению токсичных для микроорганизмов соединений, поэтому в последнее время разрабатываются методы ферментативного гидролиза ксилана.

Большое внимание уделяется различным видам *растительной массы*: плоды, соки, клубни, травяная масса и упоминавшаяся выше древесина. Используются также отходы сельского хозяйства, деревообрабатывающей и бумажной промышленности, а также многих отраслей пищевой промышленности.

Возможность использования перечисленных сырьевых материалов является основой создания безотходных производств. Поэтому многие полагают, что в качестве доступного и, по-видимому, относительно дешевого сырья для биотехнологии окажутся различные побочные продукты одних биотехнологических процессов для других. Например, на отходах микробиологического производства этанола можно с успехом культивировать кормовые дрожжи. Или же при получении биомассы путем выращивания дрожжей на гидролизатах растительного сырья на фильтрах можно осуществлять биосинтез грибного белка. Либо на биомассе одного микроорганизма выращивать другие виды.

9. КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК

Список типов клеток, которые в настоящее время можно культивировать, достаточно велик. Это элементы соединительной ткани (фибробласты), скелетные ткани (кость и хрящи), скелетные, сердечные и гладкие мышцы, эпителиальные ткани (печень, легкие, молочная железа, кожа, мочевого пузыря, почки), клетки нервной системы (глиальные клетки и нейроны, хотя последние лишены способности к пролиферации), эндокринные клетки (надпочечники, гипофиз, клетки островков Лангерганса), меланоциты и много различных типов опухолевых клеток.

Использование маркёров, специфических для данного типа клеток, позволяет определять предков, от которых получены такие культуры, но далеко не во всех случаях удается установить положение клеток в их «родословной». Чтобы клетки пролиферировали, они должны происходить скорее от недифференцированных клеток-предшественников, чем от полностью дифференцированных клеток, у которых способность к пролиферации в норме утрачивается. Однако популяция не обязательно должна быть гомогенной и обладать фиксированным фенотипом. Некоторые культуры, например кератиноциты эпидермиса, содержат стволовые клетки, клетки-предшественники и кератинизированные чешуйчатые клетки. В такой культуре происходят постоянное обновление за счет стволовых клеток, пролиферация и созревание клеток-предшественников и терминальная необратимая дифференцировка, сопровождающаяся «слушиванием» чешуйчатых клеток в культуральную среду. Культуры других клеток, например фибробласты, представляют собой относительно однородную популяцию пролиферирующих клеток при низкой плотности монослоя (~104 клеток/см²) и столь же однородную популяцию более дифференцированных, непролиферирующих клеток при высокой плотности монослоя (105 клеток/см²). Эта популяция фиброцитподобных клеток при высокой плотности монослоя способна к возвращению в клеточный цикл в результате трипсинизации, снижающей плотность клеток в монослое, или соскоба части клеток, приводящего к появлению свободного «края» монослоя.

Дифференцировка и пролиферация клеток регулируются (во многих случаях реципрокно) не только плотностью монослоя, но и питательными факторами среды (сыворотка, ионы Ca²⁺), гормонами, взаимодействием с внеклеточным матриксом. Важно, таким образом, не только установить родословную используемых клеток, но и охарактеризовать и стабилизировать стадию их дифференцировки, подбирая плотность клеток, а также питательные и гормональные факторы для получения однородной клеточной популяции.

Динамические свойства культивируемых клеток часто трудно контролировать, и некоторые клеточные взаимодействия, наблюдаемые *in vivo*, бывает трудно реконструировать *in vitro*. В связи с этим многие исследователи отказываются от идеи серийного размножения клеток *in vitro*,

предпочитая использовать клеточные системы, сохраняющие структурную целостность исходной ткани. Такие системы, получившие название гистио-типических или органных культур. Делались также попытки воссоздания тканеподобных структур *in vitro* путем реагрегации различных типов клеток и их культивирования при высокой плотности в форме сфероидов, перфузируемой многослойной культуры на пластиковом или стеклянном субстрате, или культивирования на микроносителях (коллагеновые волокна или синтетические микропористые фильтры).

Дифференцировка

Ведение клеточных линий требует постоянного увеличения числа клеток. Поэтому неудивительно, что продолжавшийся много лет выбор условий культивирования был направлен на обеспечение максимальной скорости клеточной пролиферации. Эти условия, как правило, оказывались неблагоприятными для дифференцировки клеток, при которой их рост существенно ограничивается или полностью подавляется. К условиям, способствующим размножению, относятся низкая плотность клеток, низкая концентрация Ca^{2+} (100-600 мкМ) и присутствие ростовых факторов, таких как фактор роста эпидермиса (ФРЭ), фактор роста фибробластов (ФРФ) и фактор роста, синтезируемый тромбоцитами (ФРСТ). Высокая плотность клеток (выше 10⁵ клеток/см²), высокие концентрации Ca^{2+} (300-1500 мкМ) и присутствие индукторов дифференцировки (гормоны, например гидрокортизон, фактор созревания глии, фактор роста нервов, ретиноиды и полярные растворители, такие как диметилсульфоксид) способствуют прекращению клеточного деления и индуцируют дифференцировку клеток.

Роль сыворотки в дифференцировке до конца еще не выяснена, и действие ее зависит от типа клеток и состава используемой среды. Низкие концентрации сыворотки способствуют дифференцировке олигодендроцитов, но для дифференцировки бронхиального эпителия в ороговевающий используются высокие концентрации сыворотки. В последнем случае активным началом оказываются молекулы сыворотки, близко родственные или идентичные фактору опухолевого роста ρ , выделяемому из тромбоцитов. Решению проблем, связанных с влиянием сыворотки на дифференцировку, несомненно будет способствовать использование химически определенных сред.

Большое значение, особенно для эпителия, имеет установление правильной полярности клеток и их формы. Во многих исследованиях было показано, что клетки, растущие на взвеси коллагенового геля, омываются питательной средой со всех сторон, и это позволяет устанавливать правильную полярность относительно базальной мембраны, а также поддерживать правильную форму клеток благодаря пластичности субстрата.

Итак, для размножения и дифференцировки клеток требуются различные условия культивирования. В ряде экспериментов требуется чередование фазы роста, результатом которой является наращивание клеточной массы, и фазы созревания, в которой клетки не растут, но в них

экспрессируются те или иные признаки.

Субкультивирование

Свежевыделенные культуры носят название первичных культур до начала пассирования или субкультивирования. Клетки первичной культуры обычно гетерогенны и характеризуются малым пролиферативным пулом, но в них наиболее полно представлены типы клеток той ткани, откуда они были получены, а также четко обнаруживается экспрессия ряда свойств, присущих данной ткани. Субкультивирование обеспечивает возможность продления существования культуры (в результате субкультивирования получают линии клеток), возможность клонирования, исследования и сохранения клеток, а также получения более однородных популяций. При этом во многих случаях субкультивирование приводит к потере специализированных клеток и дифференцировочных признаков, если не принимаются меры для отбора специализированных линий, и сохранения или реиндукции дифференцировочных свойств.

Главным преимуществом получения клеточных линий из первичных культур является наработка большого количества стабильного материала, пригодного для продолжительного использования.

Выбор среды

Выбор среды, к сожалению, часто происходит чисто эмпирически и диктуется, в частности, тем, какую среду использовали в вашей лаборатории для работы с другими клетками или какую среду использовали ранее другие исследователи для работы с клетками, аналогичными вашим. Это не столь важно для постоянных линий клеток, но при работе со специализированными клетками, с первичными культурами, при выращивании клеток в отсутствие сыворотки выбор среды может иметь принципиальное значение.

Использование более сложных сред в отсутствие сыворотки обеспечивает два преимущества: такие среды могут быть селективными для определенного типа клеток, а отсутствие сыворотки облегчает выделение из среды требуемых продуктов клеточного метаболизма.

Тем не менее, культивирование в присутствии сыворотки проще и, как ни странно, часто оказывается не более дорогим, хотя, конечно, менее контролируемо.

Две главные причины все еще ограничивают применение бессывороточных сред:

а) очень медленно растет выпуск коммерческих ингредиентов таких сред (не многие исследователи способны изготавливать среды собственными силами)

б) потребности в бессывороточной среде в большей степени зависят от типа используемых клеток.

Сыворотка нивелирует многие недостатки среды, которые могут проявляться в ее отсутствие. Проблема может стать особенно острой при культивировании опухолевых клеток; клеточные линии, происходящие из разных опухолей, могут требовать модификации культуральной среды.

В конце концов, выбор среды все еще остается эмпирическим. Просмотрите литературу и выясните, какая среда использовалась ранее. Если использовалось несколько различных сред (как это чаще всего и бывает), проверьте все эти среды, а также некоторые другие по вашему выбору. Оцените рост культуры (время генерации и плотность насыщения), эффективность клонирования, экспрессию специфических свойств (дифференцировка, размножение вируса, выход клеточного продукта и т. д.). Выбор среды может оказаться неодинаковым по этим параметрам: так, например, дифференцировка легочного эпителия лучше проходит в присутствии сыворотки, а размножение этих клеток – в отсутствие сыворотки. Если возможно, используйте в своей работе одну или несколько бессывороточных сред с добавлением в случае необходимости факторов роста, гормонов и микроэлементов.

Остановившись на каком-то одном типе среды, старайтесь как можно дольше его не менять. Аналогично при использовании сыворотки постарайтесь обеспечить себя сывороткой одной партии на 0,5-1 год работы, прежде чем заменить ее на предварительно опробованную сыворотку другой партии.

Во многих лабораториях в настоящее время для культур тканей используется пластмассовая посуда одноразового применения. Эти сосуды оптически прозрачны и подготовлены для использования в культивировании тканей путем модификации пластика, увеличивающей его смачиваемость и облегчающей прикрепление клеток. Некоторые культуральные сосуды выпускаются в стерилизованном виде. В целом пластмассовую посуду удобно применять и в процессе наращивания клеток, и для решения экспериментальных задач. В то же время одноразовая культуральная посуда является дорогой.

Большинство обычно используемых сред поставляется производственными предприятиями, но среды специального состава или добавки к ним приходится готовить и стерилизовать самостоятельно. Как правило, стабильные растворы (вода, солевые растворы и такие добавки к средам, как триптоза и пептон) стерилизуются автоклавированием (121 °C при 1 атм избыточного давления). Нестабильные растворы (полная среда, трипсин, сыворотка) стерилизуются фильтрованием через мембраны с диаметром пор 0,2 мкм (фирмы Millipore, Sartorius, Gelman, Pall).

При использовании автоматизированных автоклавов нужно следить, чтобы продолжительность цикла определялась температурой загруженного материала, а не величиной давления или температурой камеры или теплоносителя, которые увеличиваются с большей скоростью, чем температура автоклавируемого материала.

Проверка стерильности должна проводиться для каждого фильтрованного образца.

Первичная культура

Первичной называется культура, полученная из ткани и выращиваемая

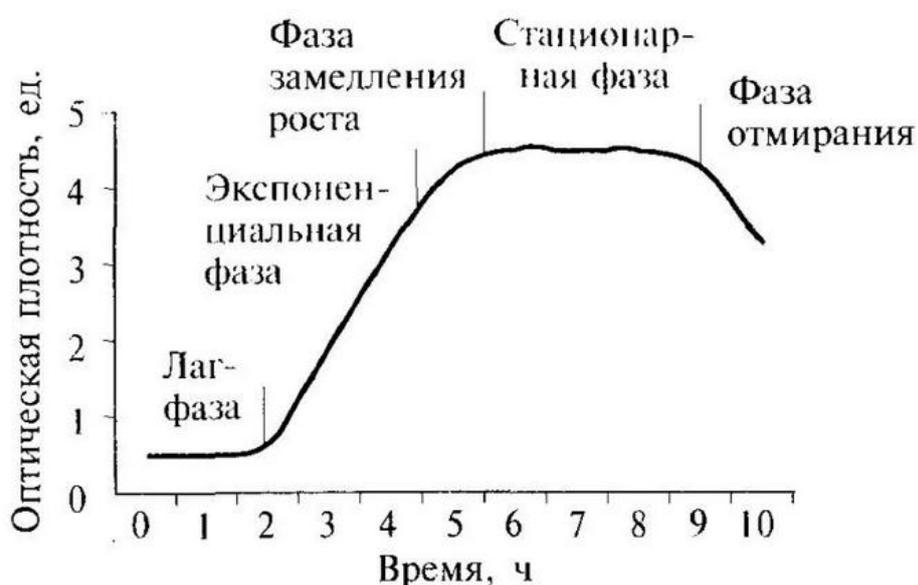
in vitro до начала субкультивирования, то есть до первого посева. Первичная культура лишена многих клеток, присутствующих в исходной ткани, поскольку не все клетки способны прикрепиться к субстрату и выжить в условиях *in vitro*. Далее, при пролиферации культивируемых клеток происходит относительное обеднение культуры неделящимися или медленно делящимися клетками. Поэтому на этой стадии может оказаться необходимым проведение отбора специфических типов клеток путем клонирования, селективного культивирования или физического разделения клеток.

На первом этапе получения первичной культуры происходит стерильное удаление фрагмента ткани животного и его механическая или ферментативная дезагрегация. Ткань может быть просто измельчена до кусочков объемом около 1 мм³, которые прикрепляются к поверхности чашки благодаря собственной адгезивности, или наличию насечек на чашке или с помощью сгустка плазмы. В этих случаях будет происходить рост клеток из фрагментов и клетки, мигрирующие из эксплантатов, могут использоваться для пассирования. Фрагменты ткани (эксплантаты) могут переноситься на новые чашки; мигрирующие клетки могут удаляться трипсинизацией, а остающийся эксплантат будет образовывать новые выросты. Трипсинизированные клетки пересеваются в новые сосуды и становятся вторичной культурой. По формальным признакам такая культура носит название линии клеток.

Первичные культуры могут быть также получены путем дезагрегации тканей ферментами, например трипсином (0,25%-ный неочищенный или 0,01-0,05%-ный очищенный) или коллагеназой (200-2000 ед./мл, неочищенная). Клетки образующейся при этом суспензии оседают, прикрепляются и распластываются на поверхности стекла или пластика. Такой способ получения культуры обеспечивает более высокий выход клеток, хотя он кажется более селективным, поскольку только определенные клетки переживают диссоциацию. На практике успешное получение первичных культур из многих тканей, особенно из эпителия, связано с использованием коллагеназы; при этом размер эксплантата снижается до небольшого кластера клеток, который затем прикрепляется к субстрату и разрастается.

Монослойная культура может быть перенесена во второй культуральный сосуд после диссоциации клеток монослоя трипсином и разведения. В случае субкультивирования суспензионных культур достаточно только разведения. Диссоциация клеток монослойной культуры достигается лучше всего промыванием монослоя фосфатным солевым буфером (ФСБ) или ФСБ с 1мМ этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА) и последующей инкубацией с холодным раствором трипсина (0,25%-ный неочищенный или 0,01-0,05%-ный очищенный) в течение 30 с. После этого трипсин удаляется, клетки инкубируют дополнительно в течение 15 мин. Затем клетки суспендируют в среде, определяют их количество и рассеивают на новые флаконы.

После посева клеток во флакон они входят в лаг-период продолжительностью 2-24 ч, сменяющийся периодом экспоненциального роста (логарифмическая фаза). В конце этого периода клетки достигают плотного монослоя и входят в период медленного роста или покоя (фаза плато). Эти фазы характерны для всех клеточных линий и позволяют получить воспроизводимые характеристики клеточных линий: продолжительность лаг-периода, время удвоения популяции в середине логарифмической фазы и насыщающую плотность клеток в монослое на фазе плато. Воспроизводимость этих характеристик возможна только при постоянстве условий культивирования.



Определение параметров ростового цикла весьма существенно для пассирования культуры и для проведения экспериментов на культурах. Поведение клеток и их биохимические свойства заметно различаются на разных фазах роста культуры, так что важно контролировать стадию ростового цикла, на которой в культуру добавляются различные препараты или реагенты или производится сбор клеток для пересева. Форма кривой роста позволяет также получить информацию о репродуктивном потенциале культуры. Не вызывает сомнения, что клональный анализ довольно прост и приводит к получению более однозначных и правильных выводов.

Факторы роста

Большинство ростовых факторов присутствуют в сыворотке в концентрации нескольких нанограммов на миллилитр и ниже. Некоторые из этих факторов специфичны для клеток на определенной стадии дифференцировки, как, например, гематопоетический фактор роста (колониестимулирующий фактор). Некоторые факторы действуют синергически, а действие ряда факторов не ограничено каким-либо одним типом клеток. Так, ФРЭ способствует пролиферации фибробластов,

эпидермальных клеток и клеток глии. Один и тот же тип клеток может быть стимулирован различными ростовыми факторами. Так, фибробласты размножаются в ответ на ФРФ, ФРЭ, ФРСТ и соматомедины. К настоящему времени физиологическая роль всех этих многочисленных факторов не выяснена.

Гормоны

Среди гормонов наиболее важным для обеспечения роста почти всех типов клеток в культуре оказывается инсулин. Этот гормон обычно добавляют в культуру в относительно высокой концентрации, так как он быстро распадается, а также инактивируется цистеином. Глюкокортикоиды (гидрокортизон, дексаметазон) могут стимулировать или подавлять рост клеток в культуре в зависимости от типа клеток и их плотности. Глюкокортикоиды влияют на пролиферацию клеток, изменяя их чувствительность к факторам роста. Некоторые линии клеток нуждаются в других стероидных гормонах (эстрадиол, тестостерон, прогестерон). Гормоны щитовидной железы (главным образом трийодтиронин) оказываются активными в поддержании роста некоторых клеточных линий.

Факторы прикрепления и распластывания

Одной из главных функций сыворотки является обеспечение клеток факторами прикрепления и распластывания, незаменимыми компонентами внеклеточного матрикса. Многие клетки млекопитающих, прежде чем начать пролиферацию и образовать клеточный монослой, должны прикрепиться к субстрату и распластаться на нем.

Транспортные белки

Сыворотка является также источником некоторых, так называемых транспортных белков, роль которых заключается в переносе незаменимых низкомолекулярных факторов. Альбумин среди прочих факторов переносит витамины, липиды (жирные кислоты, холестерин) и гормоны. Насыщенный железом трансферрин незаменим для большинства культивируемых клеток, которые несут на своей поверхности специфические рецепторы для этого белка.

Липиды

Сыворотка является богатым источником различных липидов, необходимых культивируемым клеткам для выживания и роста. Линии клеток различаются по потребности в незаменимых жирных кислотах, фосфолипидах, лецитине и холестерине. Так, например, оптимальный баланс жирных кислот и холестерина варьирует в значительных пределах для различных линий кроветворных клеток и для одной и той же линии на разных стадиях созревания. Было показано, что простагландины (ПГ) E и E₂O вовлечены в регуляцию клеточной пролиферации и действуют совместно с ростовыми факторами, такими как ФРЭ.

Минеральные вещества

Роль присутствующих в сыворотке неорганических микроэлементов (Си, Zn, Со, Mn, Мо, Va, Se) выяснена далеко не полностью, но многие из них могут быть кофакторами ферментов. Так, например, ионы требуются для

активации ряда ферментов метаболической детоксикации. Ионы селена могут также участвовать в инактивации свободных радикалов.

Аппаратура для культивирования. Стандартные сосуды с перемешивающим цилиндром непригодны для этого типа культур без модификации системы перемешивания.

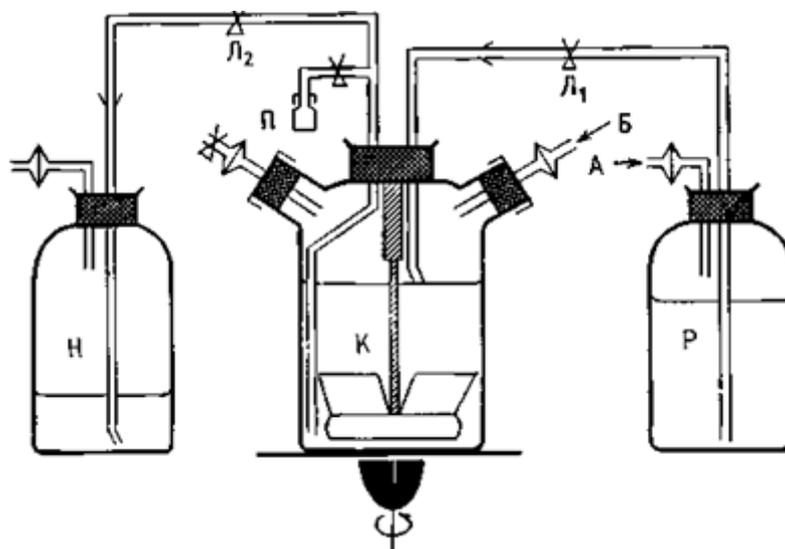


Рисунок 52. - Простые системы культур на микроносителях, обеспечивающие легкую смену среды. Для заполнения культурального сосуда К открыть вентиль Л1 и перекачать среду из резервуара Р, нагнетая воздух через трубку А. Для отбора клеток остановить на 5 мин мешалку, открыть вентиль Л2 и перекачать среду из К в Н, нагнетая воздух через трубку Б. П – устройство для отбора проб.

Посев культуры. При посеве культуры с микроносителями критичными оказываются многие факторы. Микроносители имеют сферическую форму, а клетки всегда прикрепляются к участкам с минимальной кривизной. Хотя поверхность микроносителей не может быть идеальной, но она обязана быть приемлемой по своим химическим и физическим свойствам. Убедившись в том, что среда и гранулы находятся при оптимальных рН и температуре, вносите в культуру клетки (с логарифмической, но не со стационарной фазы культуры) в объеме среды, составляющем треть конечного объема. Это увеличивает вероятность контакта клетки с микроносителем. Конечная концентрация микроносителей должна составлять 2-3 г/л, а более высокие концентрации требуют повышенного контроля условий культивирования и очень частых смен среды. Раньше предпочитали проводить связывание клеток с микроносителями в стационарной культуре, перемешивая ее каждые 30 мин в течение 30 с. Это, однако, всегда приводило к неравномерному распределению клеток между гранулами микроносителя, и в настоящее время резкое улучшение качества микроносителей позволяет начинать перемешивание немедленно при минимально возможной скорости,

обеспечивающей полное перемешивание (10-25 об/мин).

Поддержание культуры. Анализ роста клеток в культуре на микроносителях не представляет никакой проблемы. Легко производится отбор проб, определяется число клеток (по подсчету ядер), концентрация глюкозы и исследуется морфология клеток. По мере роста клеток гранулы микроносителя становятся тяжелее, что требует увеличения скорости вращения. После 3 дней культивирования или около того происходит закисление культуры и следует сменить среду. Это также оказывается чрезвычайно простой процедурой: мешалка отключается, гранулам с клетками дают осесть в течение 5 мин и затем удаляется столько среды, сколько нужно. После этого культура осторожно заполняется свежей средой, нагретой до 37 °С, и перемешивание возобновляется.

Сбор клеток. Для многих типов клеток сбор их с микроносителей оказывается весьма трудной задачей, если клетки не достигнут высокой плотности на гранулах. К сожалению, нет оснований ожидать многослойного роста клеток на микроносителях; это случается крайне редко. Сбор клеток начинается с удаления среды, по крайней мере одноразовой промывки гранул с клетками буфером и суспендирования микроносителей с клетками в растворе соответствующего фермента. Культура затем перемешивается при высокой скорости (75-125 об/мин) в течение 20-30 мин. Если клетки открепятся, то значительная их часть может быть собрана, если дать гранулам осесть в течение 2 мин и затем декантировать супернатант. Для более полного отбора смесь переносится в стеклянный фильтр с крупными порами. Клетки будут проходить через фильтр, а гранулы микроносителя задержатся на нем.

Применение новых образцов микроносителей сильно упростило сбор клеток. Получены покрытые коллагеном гранулы Цитодекса-3, с которых клетки снимаются коллагеназой. Желатиновые гранулы фирмы Corning могут солиubilizироваться трипсином и/или эгилендиаминтетраацетатом (ЭДТА).

Увеличение масштаба культур на микроносителях. Увеличение масштаба может быть достигнуто а) увеличением концентрации микроносителей и б) увеличением размера культур. Если идти по пути а), то возникают быстрое истощение питательных веществ и кислорода в среде и снижение рН до нефизиологических значений. Смены среды не только утомительны, но и приводят к нежелательным быстрым изменениям окружающих условий. Для получения культур с высокой концентрацией микроносителей следует применять либо проточную перфузию, либо перфузию по замкнутому контуру. А это может быть достигнуто только при использовании высокоэффективных систем фильтрации, чтобы среда без клеток и микроносителей удалялась с высокой скоростью. Единственный удовлетворительный способ достижения этого результата возможен при использовании системы фильтрации, изображенной на рис. 53. Система включает в себя сито из нержавеющей стали с диаметром пор 60-120 мкм. Крепление сита на валу мешалки обеспечивает использование большой

площади поверхности фильтра, и его вращение препятствует прикреплению клеток и забиванию пор.

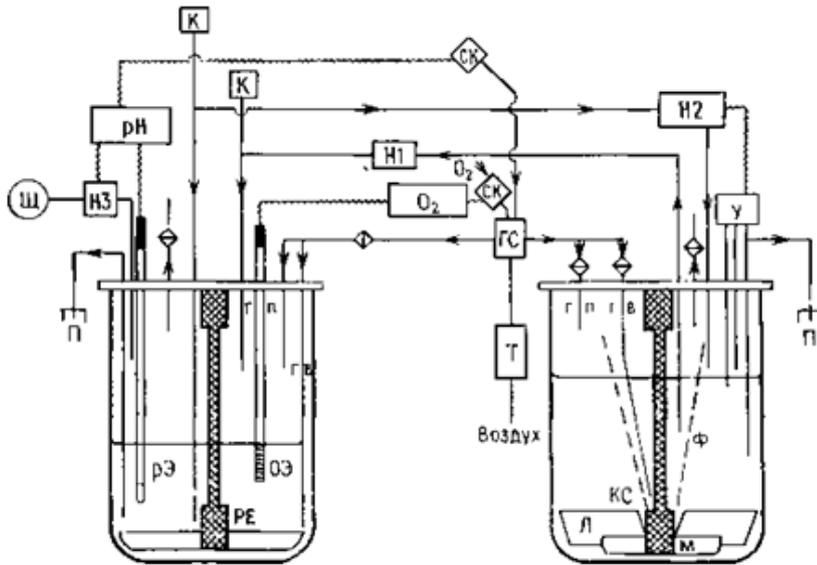


Рисунок 53. - Система перфузии по замкнутому контуру с полным контролем параметров среды для выращивания клеток при высокой концентрации микроносителей. КС - культуральный сосуд; РЕ - резервуар; К - коннектор для смены среды, сбора и т. д.; Ф - фильтр; ГС - газовый смеситель; У - контроллер уровня; П - устройство для отбора проб; М - магнит; Щ - резервуар со щелочью (NaOH); ОЭ - кислородный электрод; рЭ - рН электрод; Н - насосы; Н1- среда к резервуару (постоянно); Н2 - среда в культуру (контролируется У); Н3 - щелочь к резервуару (контролируется рН-метром); Т - измеритель скорости тока воздуха; гп - поступление газа для поверхностной аэрации; гв - поступление газа для пробулькивания; СК - соленоидный клапан; Л - лопасти

Снабжение кислородом культур с микроносителями может осуществляться благодаря следующим системам:

- а) Поверхностная аэрация.
- б) Увеличение скорости перфузии полностью оксигенированной среды из резервуара.
- в) Пробулькивание защищенного фильтром отсека.

10. ТИПЫ И РЕЖИМЫ ФЕРМЕНТАЦИИ

Ферментация – процесс, в котором происходит преобразование исходного сырья в продукт с использованием биохимической деятельности микроорганизмов или изолированных клеток.

Практически синонимами слова «ферментация» можно считать такие термины, как культивирование, выращивание микроорганизмов, биосинтез.

Следует отличать ферментацию от биокатализа (в котором уже полученный ранее фермент или биомасса микроорганизмов используются как катализаторы биохимического процесса синтеза продукта из исходного сырья и реагентов) и от биотрансформации (в этом процессе также применяется биокатализатор в виде фермента или биомассы микроорганизмов, но исходное вещество по химической структуре мало отличается от продукта биотрансформации).

По признаку целевого продукта процесса ферментация может быть следующих типов:

1) ферментация, в которой целевым продуктом является сама биомасса микроорганизмов; именно такие процессы часто обозначают словами «культивирование», «выращивание»;

2) целевым продуктом является не сама биомасса, а продукты метаболизма – внеклеточные или внутриклеточные; такие процессы часто называют процессами биосинтеза;

3) задачей ферментации является утилизация определенных компонентов исходной среды; к таким процессам относятся биоокисление, метановое брожение, биокомпостирование и биodeградация.

Исходную среду в процессах ферментации или ее основной компонент часто обозначают словом «субстрат».

По основной фазе, в которой протекает процесс ферментации, различаются:

1) поверхностная (твердофазная) ферментация (культивирование на агаровых средах, на зерне, производство сыра и колбас, биокомпостирование и др.);

2) глубинная (жидкофазная) ферментация, где биомасса микроорганизмов суспендирована в жидкой питательной среде, через которую при необходимости продувается воздух или другие газы;

3) газофазная ферментация, в которой процесс протекает на твердом носителе, где закрепляются микроорганизмы, но сами частицы носителя взвешены в потоке газа, насыщенном аэрозолем питательной среды. Надо сказать, что подобный способ ферментации используется довольно редко, в основном при очистке газов от вредных и одорирующих примесей.

По отношению к кислороду различают аэробную, анаэробную и факультативно-анаэробную ферментацию – по аналогии с классификацией самих микроорганизмов.

По отношению к свету – световая (фототрофная) и темновая (хемотрофная) ферментация.

По степени защищенности от посторонней микрофлоры – асептическая, условно асептическая и неасептическая ферментация. Иногда асептическую ферментацию называют стерильной, что неверно: в среде есть целевые микроорганизмы, но нет чужеродных.

В условно асептической ферментации допускается некоторый уровень попадания посторонней микрофлоры, которая способна сосуществовать с основной или по содержанию не превышает определенного предела.

По числу видов микроорганизмов различают ферментации на основе монокультуры (или чистой культуры) и смешанное культивирование, в котором осуществляется совместное развитие ассоциации двух или более культур.

По способу организации процессы ферментации могут быть:

- 1) периодические;
- 2) непрерывные;
- 3) многоциклические;
- 4) отъемно-доливные;
- 5) периодические с подпиткой субстрата;
- 6) полунепрерывные с подпиткой субстрата.

Все эти виды ферментации (по способу их организации) легко идентифицировать по способу загрузки сырья и выгрузки продукта.

В периодических процессах загрузка сырья и посевного материала в аппарат производится одновременно, затем в аппарате в течение определенного времени идет процесс, а после его завершения полученная ферментационная жидкость выгружается из аппарата. На рис. 54 представлен график изменения объема среды в аппарате во времени при периодической ферментации.



Рисунок 54. - Изменение объема жидкости во времени при переодическом способе ферментации

t_0 – время подготовки аппарата

t_k – время завершения ферментации

V – объем среды в аппарате

В непрерывных процессах загрузка и выгрузка среды протекают непрерывно и одновременно, причем скорость подачи в аппарат свежей питательной среды равна скорости отбора из аппарата ферментационной жидкости. В итоге объем среды в аппарате сохраняется постоянным в течение длительного времени (рис. 55), теоретически – бесконечно, а

практически – до какой-нибудь неполадки.

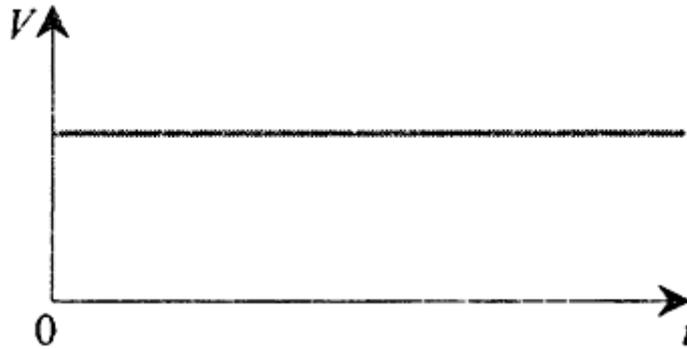


Рисунок 55. - Зависимость объема жидкости от времени при непрерывной ферментации

Многоциклические процессы в основном напоминают периодические, но при выгрузке в аппарате оставляется часть ферментационной жидкости, которая служит посевным материалом для следующей ферментации (цикла), и только после этого добавляется свежая питательная среда (рис. 56). Такая организация процесса позволяет обойтись без специальной стадии приготовления посевного материала.

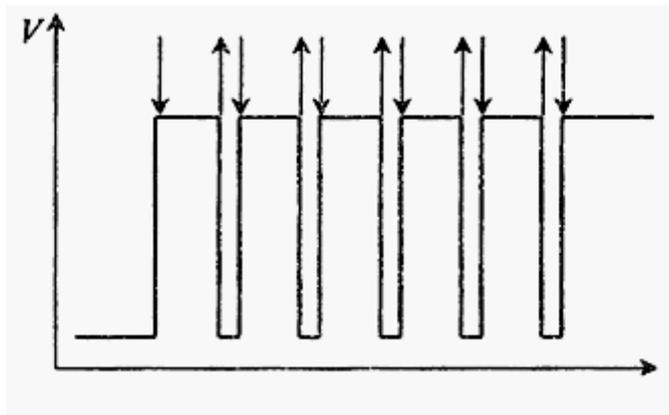


Рисунок 56. - Изменение объема жидкости от времени при многоциклической ферментации. Стрелки вниз указывают загрузку свежей среды, а стрелки вверх – разгрузку аппарата

В отъемно-доливных процессах ферментация в промежутках между загрузкой и разгрузкой аппарата протекает как периодическая, но после некоторого времени, определяемого по состоянию

процесса, часть ферментационной среды выгружают и заменяют свежей средой. Процесс при таких частых отборах и добавлениях среды протекает по- другому, чем в строго периодическом процессе, и часто имеет лучшие характеристики, а не только обеспечивает экономию на посевном материале.

В периодическом процессе с подпиткой субстрата часть среды загружается в начале ферментации, а другая часть добавляется непрерывно по мере протекания процесса (рис. 57). Естественным завершением процесса

является переполнение аппарата, поэтому необходимо переходить на строго периодический процесс с максимальным объемом среды и быстро завершать его.

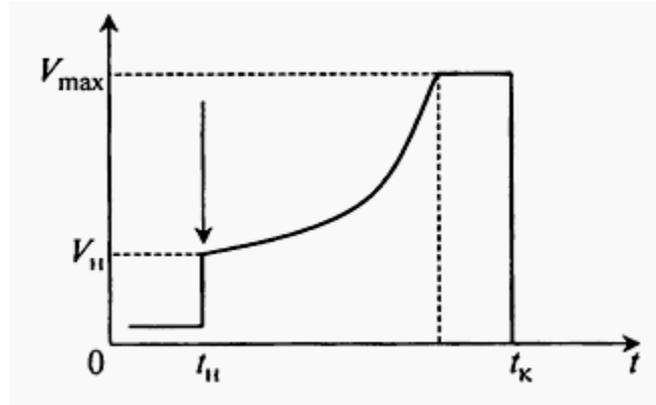


Рисунок 57. - Изменение объема жидкости от времени в периодическом процессе с подпиткой субстрата. Стрелка указывает начало подпитки

Полунепрерывные процессы с подпиткой субстрата являются сочетанием отъемно-доливных и подпиточных (рис. 58). В рассмотренном процессе с подпиткой после достижения определенного состояния происходит отбор части ферментационной жидкости из аппарата, а затем постепенное добавление субстрата до нового заполнения аппарата.

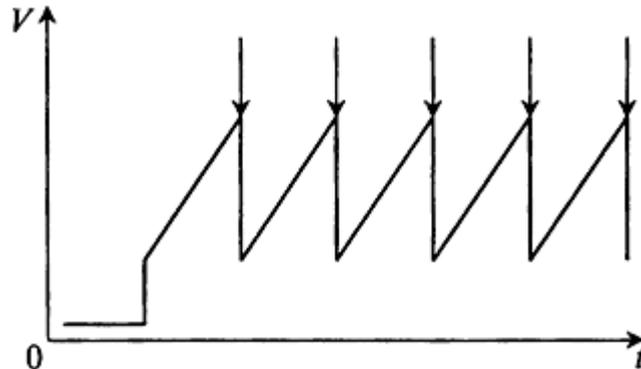


Рисунок 58. - Изменение объема жидкости от времени в полунепрерывном процессе с подпиткой субстрата. Стрелками вниз указаны моменты отбора части жидкости из аппарата

В результате удастся снять с одного аппарата во много раз больше культуральной жидкости, да и процесс при этом протекает значительно интенсивнее.

Следует отметить, что во всех случаях здесь имеется в виду основной материальный поток жидкости. Воздух, например, для аэробной ферментации добавляется непрерывно даже и в периодических процессах, то же часто бывает при добавлении щелочи для регулирования величины рН или жидкого пеногасителя.

Рассмотрим теперь более подробно *периодическую ферментацию*. Основные параметры процесса. После того как в аппарат загрузили среду, создали необходимую температуру, добавили посевной материал и стали подавать воздух для аэрации, собственно говоря, и начался процесс ферментации. Как следить за протеканием этого процесса? Для этого необходимо время от времени или непрерывно определять, какие изменения происходят в ферментационной среде.

Обычно состояние процесса характеризуется следующими основными параметрами:

- концентрация биомассы микроорганизмов X
- концентрация питательной среды – субстрата (или его основного компонента) S ;
- концентрация продукта P .

Все эти концентрации приведены к единице объема среды. Фазы периодической ферментации. Рассмотрим, как изменяется концентрация биомассы в процессе периодической ферментации (фазы ферментации) (рис. 59).

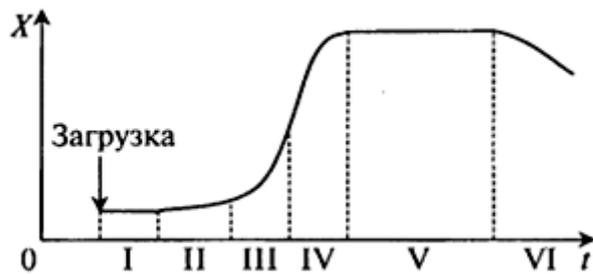


Рисунок 59. - Определение фаз ферментации по кривой роста биомассы во времени в периодическом процессе:

I – лаг-фаза

II – фаза ускорения роста

III – фаза экспоненциального роста

IV – фаза замедленного роста

V – стационарная фаза

VI – фаза отмирания

В начале ферментации некоторое время микроорганизмы как бы приспосабливаются к новой среде, их концентрация не меняется. Этот период называется лаг-фаза. Далее начинается рост – это фаза ускорения роста. Третья фаза – фаза наиболее интенсивного роста, происходит наибольший относительный прирост биомассы. Это фаза экспоненциального роста. Затем скорость роста (относительная) начинает уменьшаться – это фаза замедления роста. Достигнув некоторой максимальной величины, концентрация биомассы далее перестает возрастать. В этой фазе – стационарной – в среде истощаются питательные вещества и накапливаются продукты обмена, тормозящие рост. Биомасса растет и одновременно происходит гибель части клеток (автолиз), так что общая концентрация сохраняется постоянной. И наконец, в фазе отмирания автолиз начинает

преобладать над ростом, и концентрация биомассы микроорганизмов снижается.

Эту кривую лучше изображать в полулогарифмических координатах $\lg X$ - t (рис. 60).

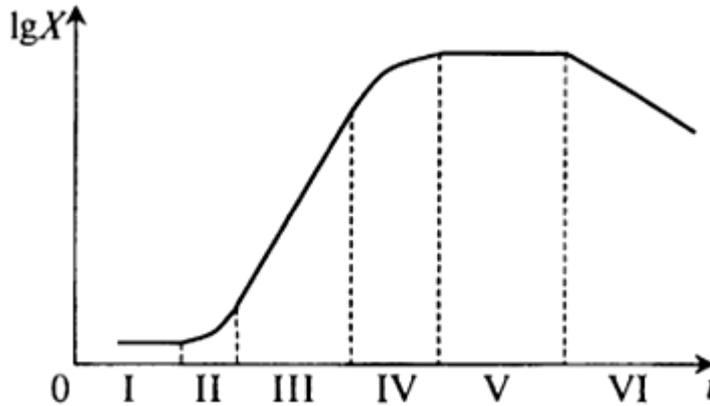


Рисунок 60. - Фазы ферментации в полулогарифмической системе координат

Здесь участок роста, имеющий постоянный наклон, сразу выделяет фазу экспоненциального роста. Остальные фазы также легко определяются.

Кинетические характеристики процесса отражают скорость протекания биохимических превращений. Эти превращения, естественно, отражаются на всех указанных «участниках» процесса – биомассе, продукте и субстрате.

Кинетические показатели роста биомассы. Важным показателем процесса является скорость роста биомассы. Хотя сам вид кривой очень похож для различных микроорганизмов, время ферментации существенно различается. Для быстрорастущих бактерий весь цикл может закончиться за несколько часов, а для мицелиальных микроорганизмов или изолированных клеток растений время составляет недели и месяцы.

Для описания скорости роста используется такая характеристика, как общая скорость роста Q_x .

$$Q_x = \frac{dX}{dt}$$

Этот показатель не вполне отражает физиологическое состояние биомассы в процессе его роста. На рис. 61 представлены два процесса, протекающие с одинаковой общей скоростью роста биомассы.

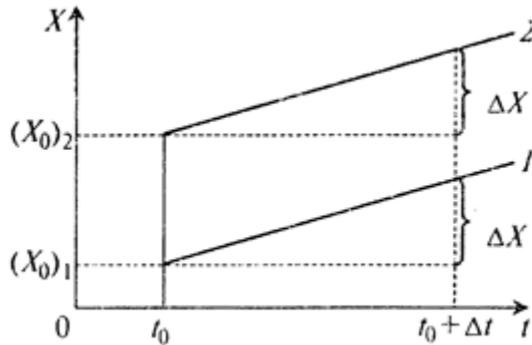


Рисунок 61. - Сравнение двух процессов ферментации (1 и 2) с одинаковой общей скоростью роста биомассы

В первом процессе исходная концентрация биомассы меньше, во втором – больше. Поэтому хотя абсолютный прирост биомассы ΔX за одинаковое время Δt такой же, относительный прирост $\Delta X/X_0$ различается существенно: в первом случае количество биомассы возрастает в несколько раз по отношению к начальному, а во втором – по отношению к начальной биомассе рост составляет всего 20-30%. Ясно, что биомасса «работает» в этих двух процессах по-разному, хотя и «выдает» одинаковое количество продукции зато же время.

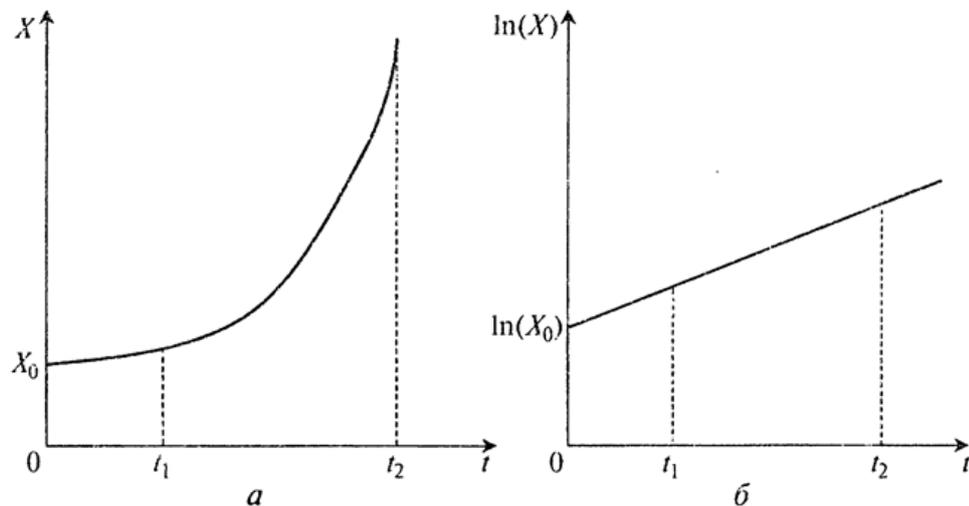


Рисунок 62. - Экспоненциальный рост биомассы во времени, представленный в обычной (а) и полулогарифмической (б) системе координат; тангенс угла наклона прямой равен μ

Обычно больший интерес для характеристики интенсивности роста представляет не величина Q_x , а удельная скорость роста в пересчете на единицу биомассы (ведь рост биомассы пропорционален концентрации клеток) μ :

$$\mu = \frac{Q_x}{X} = \frac{dX}{Xdt}$$

Надо сказать, что величина μ в ходе обычного периодического

процесса изменяется.

В экспоненциальной фазе, когда рост ничем не лимитирован, величина \ln постоянна, а рост биомассы описывается уравнением

$$\frac{dX}{dt} = \mu X.$$

Если бы процесс с самого начала определялся этой зависимостью, то концентрация биомассы изменялась бы начиная с X_0 по уравнению

$$X = X_0 e^{\mu t}. \quad (4.4)$$

Прологарифмировав обе части уравнения, получаем:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t. \quad (4.5)$$

Это уравнение показывает, почему для экспоненциальной фазы в логарифмических координатах график будет прямолинейным, причем тангенс угла наклона пропорционален μ (рис. 62).

Таким образом, по двум точкам на линейном участке полулогарифмического графика можно определить по формуле

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}.$$

Микробиологи предпочитают другой параметр – время генерации g – время, за которое биомасса культуры удваивается. Легко найти связь между величиной μ и g . Как видно из уравнения (4.4),

$$\text{при } t = 0 \quad X = X_0;$$

$$\text{при } t = g \quad X = 2X_0.$$

Тогда

$$2X_0 = X_0 e^{\mu g}. \quad (4.8)$$

$$e^{\mu g} = 2; \quad (4.9)$$

$$\mu g = \ln 2; \quad (4.10)$$

$$g = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0,69}{\mu}. \quad (4.11)$$

Удельную скорость роста и иногда называют «коэффициент скорости роста». Это не совсем правильно. Слово «коэффициент» неявно подразумевает, что это некая постоянная величина, которая не изменяется со временем. На самом деле величина μ в ходе периодического процесса изменяется, и можно построить кривую этого изменения (рис. 63). Это не коэффициент, а параметр – такой же, как X , S , P .

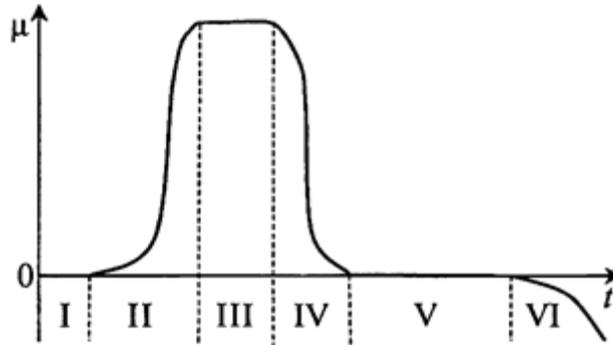


Рисунок 63. - Изменение удельной скорости роста биомассы во времени в периодическом процессе ферментации

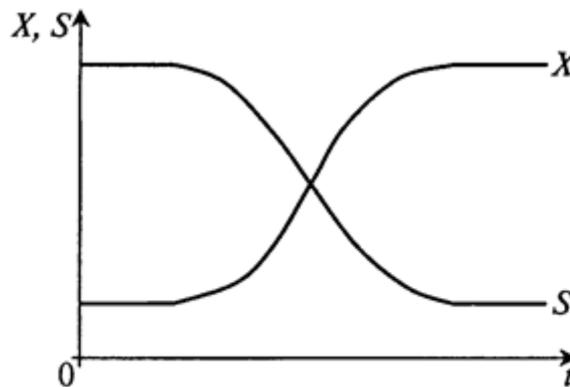


Рисунок 64. - Типичная взаимозависимость изменения во времени концентраций биомассы и субстрата

Из рис. 62 следует, что в фазе отмирания удельная скорость роста приобретает отрицательное значение.

Размерность величины (μ , – [ч⁻¹] или [мин⁻¹]), но лучше первое, так как микробиологические процессы протекают не так быстро.

Удельная скорость роста для различных видов микроорганизмов имеет разные значения. Для многих бактерий она велика и может достигать 0,5 и даже 1,0 ч⁻¹. Для грибов и актиномицетов скорость роста не выходит за пределы 0,1 ч⁻¹, а для микроводорослей, а также растительных и животных клеток находится на уровне 0,01 ч⁻¹.

Кинетика потребления субстрата. Рассмотрим теперь, что происходит со вторым параметром процесса ферментации – концентрацией субстрата S . Поскольку субстрат потребляется, его концентрация с течением времени падает, и в конце концов недостаток субстрата начинает тормозить дальнейший рост клеток микроорганизмов (рис. 64).

По аналогии со скоростью роста биомассы можно ввести кинетическую

характеристику – общую скорость потребления субстрата Q_S' .

$$Q_S = - \frac{dS}{dt}. \quad (4.12)$$

Знак (-) обозначает, что скорость потребления положительна, когда концентрация субстрата в среде падает (т.е. скорость изменения концентрации отрицательна).

Аналогично, *удельная скорость потребления субстрата*, которую обозначим буквой q_S , равна

$$q_S = \frac{Q_S}{X} = - \frac{1}{x} \frac{dS}{dt}. \quad (4.13)$$

Кинетика биосинтеза продуктов метаболизма. В некоторых процессах наряду с ростом биомассы происходит накопление в среде продукта метаболизма (его текущая концентрация P).

Общая скорость биосинтеза продукта метаболизма Q_P в периодическом процессе

$$Q_P = \frac{dP}{dt}. \quad (4.14)$$

Удельная скорость биосинтеза продукта из единицы биомассы обозначается q_P и равна

$$q_P = \frac{Q_P}{X} = \frac{1}{x} \frac{dP}{dt}. \quad (4.15)$$

Все рассмотренные ранее характеристики Q_x , μ , Q_S , q_S , Q_P и q_P являются выражением скорости изменения того или иного параметра во времени, т.е. *кинетическими* характеристиками.

Наряду с этими характеристиками важное значение имеют и так называемые *макротехнометрические*, которые выражают взаимосвязь между приростом биомассы, продукта и расходом субстрата.

Простейшей такой характеристикой процесса ферментации является *выход по субстрату*, или *экономический коэффициент* (или *коэффициент выхода*). Его определяют, сравнивая количество выросшей за весь цикл ферментации биомассы X_K к количеству загруженного субстрата S_0 (проще говорить об их концентрациях, чтобы абстрагироваться от объема среды):

$$Y = X_K / S_0. \quad (4.16)$$

Это — экономический коэффициент по биомассе, но аналогичный коэффициент может быть вычислен и по продукту метаболизма:

$$Y = P_K / S_0. \quad (4.17)$$

Ясно, что обозначения коэффициентов должны различаться. Это можно сделать с помощью индексов: первый обозначим как Y_{XS} , второй — как $Y_{P\$}$.

Вернемся к коэффициенту Y_{XS} . Понятно, что он определен не совсем точно. В начале процесса уже существует некоторое количество биомассы, определяемое ее концентрацией $X < n$, так что прирост ее за время ферментации меньше, чем X_K , и равен $(X_K - X_0)$.

В то же время не весь субстрат до конца расходуется за время процесса; какая-то часть его, определяемая конечной концентрацией S_K , останется, так что потребление субстрата будет не S_0 , а $(S_0 - S_K)$.

Таким образом, сам биологический процесс более правильно характеризовать коэффициентом, найденным по формуле

$$Y_{XS} = \frac{X_k - X_0}{S_0 - S_k} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \left[\frac{\text{г биомассы}}{\text{г субстрата}} \right]. \quad (4.18)$$

С точки зрения производителя лучше первое определение, так как остаточный субстрат — это в любом случае невосполнимые его потери, а выращенный до ферментации посевной материал — это достижение.

Аналогичным образом для продукта метаболизма:

$$Y_{PS} = \frac{P_k - P_0}{S_0 - S_k} = \frac{\Delta P}{\Delta S} \left[\frac{\text{г продукта}}{\text{г субстрата}} \right]. \quad (4.19)$$

Иногда вместо экономических коэффициентов используют обратные им и называют их *метаболическими*, или *трофическими*, *коэффициентами*:

$$Y_{SX} = \frac{1}{Y_{XS}} = \frac{S_0 - S_k}{X_k - X_0} = \frac{\Delta S}{\Delta X} \left[\frac{\text{г субстрата}}{\text{г биомассы}} \right]; \quad (4.20)$$

$$Y_{SP} = \frac{1}{Y_{PS}} = \frac{S_0 - S_k}{P_k - P_0} = \frac{\Delta S}{\Delta P} \left[\frac{\text{г субстрата}}{\text{г продукта}} \right]. \quad (4.21)$$

Любой вид экономического или трофического коэффициента можно вычислять не только по начальным и конечным значениям параметров, т. е. за весь период ферментации, но и за любой произвольно взятый промежуток времени Δt , используя для его вычисления соответственно этому промежутку определенные значения ΔX , ΔS и ΔP (рис. 65).

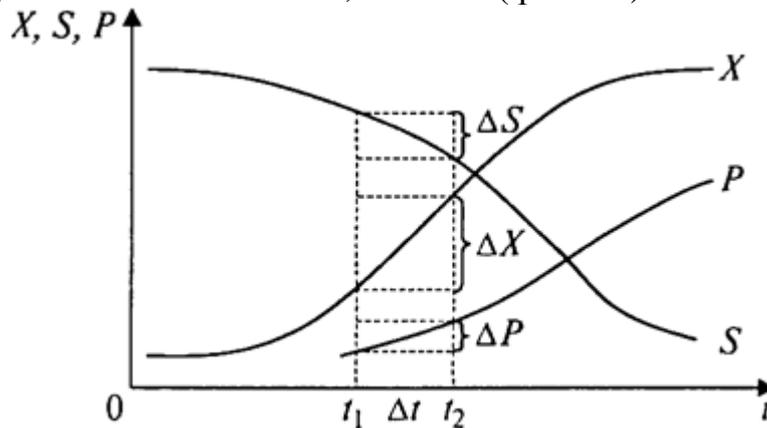


Рисунок 65. - К определению экономического коэффициента за произвольный промежуток времени

Тогда получим значения коэффициентов Y_{XS} , Y_{PS} за данный промежуток времени.

В пределе можно рассматривать промежуток Δt сколь угодно малым — вплоть до бесконечно малого dt , и ему будут соответствовать сколь угодно малые приросты $\dot{y}X$, $\dot{A}P$ и $\dot{d}S$.

Так же можно получить мгновенные текущие коэффициенты (будем их в общем виде называть относительными стехиометрическими

коэффициентами):

$$Y_{XS} = \frac{dX}{dS}; (4.22) \quad Y_{PS} = \frac{dP}{dS}; (4.23) \quad Y_{SX} = \frac{dS}{dX}; (4.24) \quad Y_{SP} = \frac{dS}{dP}. (4.25)$$

Можно определить и еще пару относительных коэффициентов (образования продуктов в соответствии с приростом биомассы):

$$Y_{PS} = \frac{dP}{dX}; (4.26) \quad Y_{XS} = \frac{dX}{dP}. (4.27)$$

11. ВЫДЕЛЕНИЕ И СЕЛЕКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Основой большинства современных биотехнологических производств до сих пор все еще является микробный синтез, т. е. синтез разнообразных биологически активных веществ с помощью микроорганизмов. К сожалению, объекты растительного и животного происхождения в силу ряда причин еще не нашли столь широкого применения.

Независимо от природы объекта, первичным этапом разработки любого биотехнологического процесса является получение чистых культур организмов (если это микробы), клеток или тканей (если это более сложные организмы – растения или животные). Многие этапы дальнейших манипуляций с последними (т.е. с клетками растений или животных), по сути дела, являются принципами и методами, используемыми в микробиологических производствах. И культуры микробных клеток, и культуры тканей растений и животных с методической точки зрения практически не отличаются от культур микроорганизмов. Поэтому дальнейшие рассуждения целесообразно вести применительно к микробиологическим объектам.

Мир микроорганизмов крайне разнообразен. В настоящее время относительно хорошо охарактеризовано (или известно) более 100 тысяч различных их видов. Это в первую очередь прокариоты (бактерии, актиномицеты, риккетсии, цианобактерии) и часть эукариот (дрожжи, нитчатые грибы, некоторые простейшие и водоросли). При столь большом разнообразии микроорганизмов весьма важной, а зачастую и сложной, проблемой является правильный выбор именно того организма, который способен обеспечить получение требуемого продукта, т. е. служить промышленным целям. Разделение микроорганизмов на промышленные и непромышленные для лиц, далеких от микробиологии, молекулярной биологии и молекулярной генетики, кажется достаточно определенным: те микроорганизмы, которые используются в промышленном производстве – **промышленные**, а те, которые не используются, – **непромышленные**.

Однако для тех, кто близко соприкасается с вышеперечисленными отраслями биологических знаний, граница проходит между немногочисленной, но глубоко изученной группой микроорганизмов, служащих модельными объектами при исследованиях фундаментальных жизненных процессов, и всеми остальными микроорганизмами, которые, как правило, генетиками, молекулярными биологами и генными инженерами не изучались совсем или изучались в очень ограниченной степени. К числу первых относятся кишечная палочка (*E. coli*), сенная палочка (*Bac. subtilis*) и пекарские дрожжи (*S. cerevisiae*).

Во многих биотехнологических процессах используется ограниченное число микроорганизмов, которые классифицируются как GRAS («generally recognized as safe» обычно считаются безопасными). К таким микроорганизмам относят бактерии *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, другие виды бацилл и лактобацилл, виды *Streptomyces*.

Сюда также относят виды грибов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* и дрожжей *Saccharomyces* и др. GRAS-микроорганизмы непатогенные, нетоксичные и в основном не образуют антибиотики, поэтому при разработке нового биотехнологического процесса следует ориентироваться на данные микроорганизмы, как базовые объекты биотехнологии.

Микробиологическая промышленность сегодня использует тысячи штаммов из сотен видов микроорганизмов, которые первично были выделены из природных источников на основании их полезных свойств, а затем (в большинстве своем) улучшены с помощью различных методов. В связи с расширением производства и ассортимента выпускаемой продукции в микробиологическую промышленность вовлекаются все новые и новые представители мира микробов. Следует отдавать себе отчет, что в обозримом будущем ни один из них не будет изучен в той же степени, как *E.coli* и *Bac.subtilis*. И причина этого очень простая – колоссальная трудоемкость и высокая стоимость подобного рода исследований.

Следовательно, возникает проблема разработки стратегии и тактики исследований, которые обусловили бы с разумной затратой труда извлечь из потенциала новых микроорганизмов все наиболее ценное при создании промышленно важных штаммов-продуцентов, пригодных к использованию в биотехнологических процессах.

Классический подход заключается в выделении нужного микроорганизма из природных условий.

Из естественных мест обитания предполагаемого продуцента отбирают образцы материала (берут пробы материала) и производят посев в селективную среду, обеспечивающую преимущественное развитие интересующего микроорганизма, т. е. получают так называемые **накопительные культуры**.

Следующим этапом является *выделение чистой культуры* с дальнейшим дифференциально-диагностическим изучением изолированного микроорганизма и, в случае необходимости, ориентировочным определением его продукционной способности.

Существует и другой путь подбора микроорганизмов-продуцентов – это выбор нужного вида из имеющихся коллекций хорошо изученных и досконально охарактеризованных микроорганизмов. При этом, естественно, устраняется необходимость выполнения ряда трудоемких операций.

Главным критерием при выборе биотехнологического объекта (в нашем случае микроорганизма-продуцента) является *способность синтезировать целевой продукт*. Однако помимо этого, в технологии самого процесса могут закладываться дополнительные требования, которые порой бывают очень и очень важными, чтобы не сказать решающими. В общих словах *микроорганизмы должны соответствовать следующим критериям:*

1. Безвредность для потребителя и обслуживающего персонала.
2. Высокая скорость роста биомассы и целевого продукта (БАВ) при экономичном потреблении питательной среды.

3. Направленная биосинтетическая активность при минимальном образовании побочных продуктов.

4. Генетическая однородность и стабильность в отношении к субстратам и условиям культивирования.

5. Отсутствие токсических веществ в целевом продукте и промышленных стоках.

6. Устойчивость к фагам и другой посторонней микрофлоре.

7. Способность расти на дешевых и доступных субстратах, отходах пищевой и химической промышленности при высокой плотности клеток.

Все вышеперечисленное обеспечивает значительное снижение затрат на производство целевого продукта. Конечно, в каждом конкретном случае ведущим является какой-то один из этих критериев, поскольку в природе устроено так, что во всем получить выигрыш не удастся никогда.

И это правило необходимо постоянно иметь в виду. Ниже приводятся примеры, имеющие своей целью проиллюстрировать ранее сказанное.

1. Одноклеточные организмы, как правило, характеризуются более высокими скоростями роста и синтетических процессов, чем высшие организмы. Тем не менее, это присуще не всем микроорганизмам. Существуют такие из них (например, олиготрофные), которые растут крайне медленно, однако они представляют известный интерес, поскольку способны продуцировать различные очень ценные вещества.

2. Особое внимание как объекты биотехнологических разработок представляют фотосинтезирующие микроорганизмы, использующие в своей жизнедеятельности энергию солнечного света. Часть из них (цианобактерии и фотосинтезирующие эукариоты) в качестве источника углерода утилизируют CO_2 , а некоторые представители цианобактерий, ко всему сказанному, обладают способностью усваивать атмосферный азот (т. е. являются крайне неприхотливыми к питательным веществам). Фотосинтезирующие микроорганизмы перспективны как продуценты аммиака, водорода, белка и ряда органических соединений. Однако прогресса в их использовании вследствие ограниченности фундаментальных знаний об их генетической организации и молекулярно-биологических механизмах жизнедеятельности, по всей видимости, следует ожидать не в скором будущем.

3. Определенное внимание уделяется таким объектам биотехнологии, как термофильные микроорганизмы, растущие при $60\text{--}80^\circ\text{C}$. Это их свойство является практически непреодолимым препятствием для развития посторонней микрофлоры при относительно не стерильном культивировании, т. е. является надежной защитой от загрязнений. Среди термофилов обнаружены продуценты спиртов, аминокислот, ферментов, молекулярного водорода. Кроме того, скорость их роста и метаболическая активность в 1,5–2 раза выше, чем у мезофилов.

Ферменты, синтезируемые термофилами, характеризуются повышенной устойчивостью к нагреванию, некоторым окислителям,

детергентам, органическим растворителям и другим неблагоприятным факторам. В то же время они мало активны при обычных температурах.

Так, протеазы одного из представителей термофильных микроорганизмов при 200 С в 100 раз менее активны, чем при 750 С. Последнее является очень важным свойством для некоторых промышленных производств.

Например, широкое применение в генетической инженерии нашел фермент Таq-полимераза из термофильной бактерии *Thermus aquaticus*. Ранее уже упоминалось о еще одном весьма существенном свойстве этих организмов, а именно, что при их культивировании температура среды, в которой они пребывают, значительно превышает температуру окружающей среды. Данный высокий перепад температур обеспечивает быстрый и эффективный обмен тепла, что позволяет использовать биологические реакторы без громоздких охлаждающих устройств. А последнее, в свою очередь, облегчает перемешивание, аэрацию, пеногашение, что в совокупности значительно удешевляет процесс.

Селекция. Неотъемлемым компонентом в процессе создания наиболее ценных и активных продуцентов, т. е. при подборе объектов в биотехнологии, является их селекция. А генеральным путем селекции является сознательное конструирование геномов на каждом этапе отбора нужного продуцента. Такая ситуация не всегда могла быть реализована, вследствие отсутствия эффективных методов изменения геномов селективируемых организмов. В развитии микробных технологий в свое время сыграли (да и сейчас еще продолжают играть!) очень важную роль методы, базирующиеся на селекции спонтанно возникающих измененных вариантов, характеризующихся нужными полезными признаками. При таких методах обычно используется ступенчатая селекция: на каждом этапе отбора из популяции микроорганизмов отбираются наиболее активные варианты (спонтанные мутанты), из которых на следующем этапе отбирают новые, более эффективные штаммы. И так далее.

Несмотря на явную ограниченность данного метода (приема), заключающуюся в низкой частоте возникновения мутантов, возможности его рано считать полностью исчерпанными.

Существуют следующие виды отбора:

Отбор по фенотипу – колонии отбирают по внешним признакам (цвет, текстура, вертикальный профиль, скорость радиального роста). Под фенотипом здесь понимают только внешнее строение, цвет, особенности споруляции и роста, но не наличие определенных метаболитов.

Направленный отбор – форма отбора, в результате которого происходит смещение среднепопуляционного значения признака в сторону, определяемую селекционером.

Дифференциальный отбор – отбор по количественному признаку, направленный на увеличение разницы между средней для вида микроорганизма величиной и средней для отобранных штаммов.

Линейный отбор – направленный отбор в ряду поколений по

нескольким направлениям, приводящий к созданию линий, в которых отбор продолжается с учетом межлинейных сравнений. Преимущество имеют микроорганизмы с отклонением от среднего значения по сравнению с исходной популяцией

Корреляционный отбор или вторичный эффект отбора – изменение признаков, не подвергающихся прямому отбору, в результате их корреляции с отбираемым признаком.

Тандемный отбор – улучшение популяции путем отбора поочередно по одному, а потом по другому признаку; оба признака экономически значимы. Производится в ряду поколений. При отрицательной корреляции между признаками эффективность отбора снижается

Процесс селекции наиболее эффективных продуцентов значительно ускоряется при использовании метода индуцированного мутагенеза. В качестве мутагенных воздействий применяются УФ, рентгеновское и гамма-излучения, определенные химические вещества и др. Однако и этот прием также не лишен недостатков, главным из которых является его трудоемкость и отсутствие сведений о характере изменений, поскольку экспериментатор ведет отбор по конечному результату. Например, устойчивость организма к ионам тяжелых металлов может быть связана с подавлением системы поглощения данных катионов бактериальной клеткой, активацией процесса удаления катионов из клетки или перестройкой системы (систем), которая подвергается ингибирующему действию катиона в клетке. Естественно, знание механизмов повышения устойчивости позволит вести направленное воздействие с целью получения конечного результата за более короткое время, а также селективировать варианты, лучше подходящие к конкретным условиям производства.

Одним из самых блестящих примеров эффективности мутагенеза с последующей селекцией по признаку увеличения образования целевого продукта является история создания современных суперпродуцентов пенициллина. Работа с исходными биообъектами – штаммами) гриба *Penicillium chrysogenum*, выделенными из природных источников, велась с 1940-х гг. в течение нескольких десятилетий во многих лабораториях. Вначале некоторый успех был достигнут при отборе мутантов, появившихся в результате спонтанных мутаций. Затем перешли к индуцированию мутаций физическими и химическими мутагенами. В результате ряда удачных мутаций и ступенчатого отбора все более продуктивных мутантов активность штаммов сейчас в 100 тыс. раз выше, чем у обнаруженного А.Флемингом исходного штамма, с которого и началась история открытия пенициллина.

Таким образом, тенденцией сегодняшнего дня является сознательное конструирование штаммов микроорганизмов с заданными свойствами на основе фундаментальных знаний о генетической организации и молекулярно-биологических механизмах осуществления основных функций организма. Короче говоря, применение перечисленных подходов в сочетании

с приемами классической селекции является сутью современной селекции микроорганизмов-продуцентов.

Селекция микроорганизмов для микробиологической промышленности и создание новых штаммов часто направлены на усиление их продукционной способности, т.е. образование того или иного продукта. Решение этих задач в той или иной степени связано с изменением регуляторных процессов в клетке, поэтому в настоящем разделе имеет смысл несколько задержаться на возобновлении сведений о регуляции биохимической активности бактериальной клетки.

Как известно, изменения скорости биохимических реакций у бактерий может осуществляться по крайней мере двумя путями. Один из них очень быстрый (реализующийся в течение секунд или минут) заключается в изменении каталитической активности индивидуальных молекул фермента. Второй, более медленный (реализуется в течение многих минут), состоит в изменении скоростей синтеза ферментов. В обоих механизмах используется единый принцип управления системами – принцип обратной связи, хотя существуют и более простые механизмы регуляции активности метаболизма клетки.

Самый простой способ регуляции любого метаболического пути основывается на доступности субстрата или наличии фермента. Действительно, снижение количества субстрата (его концентрации в среде) приводит к снижению скорости потока конкретного вещества через данный метаболический путь. С другой стороны, повышение концентрации субстрата приводит к стимулированию метаболического пути. Поэтому, независимо от каких-то иных факторов, наличие (доступность) субстрата следует рассматривать как потенциальный механизм любого метаболического пути. Иногда эффективным средством повышения выхода целевого продукта является увеличение концентрации в клетке какого-либо определенного предшественника.

Аналогичный эффект может быть получен и в результате повышения концентрации ферментов, что достигается, например, амплификацией генов, контролирующих синтез соответствующего фермента. Наиболее распространенным способом регуляции активности метаболических реакций в клетке является регуляция по типу ретроингибирования.

Биосинтез многих первичных метаболитов характеризуется тем, что при повышении концентрации конечного продукта данного биосинтетического пути угнетается активность одного из первых ферментов этого пути.

Впервые о наличии такого регуляторного механизма было сообщено в **1953** г. А. Novik и L. Szillard, исследовавшими биосинтез триптофана клетками *E. coli*. Заключительный этап биосинтеза данной ароматической аминокислоты состоит из нескольких, катализируемых индивидуальными ферментами стадий.

Указанными авторами было обнаружено, что у одного из мутантов *E.coli* с нарушенным биосинтезом триптофана добавление данной

аминокислоты (являющейся конечным продуктом этого биосинтетического пути) резко тормозит накопление одного из предшественников – индол глицерофосфата в клетках. Уже тогда было высказано предположение, что триптофан ингибирует активность какого-то фермента, катализирующего образование индол глицерофосфата.

Несколько позднее было четко установлено, что таким чувствительным к триптофану ферментом является антранилатсинтетаза, которая катализирует более раннюю реакцию триптофанового пути – образование антранилата из хоризмата и глутамин. Этот факт был экспериментально обоснован в опыте, когда добавление триптофана в клеточные экстракты *E. coli*, содержащие фермент антранилатсинтетазу и его субстраты (хоризмат и глутамин), приводило к резкому ингибированию образования антранилата. Более того, было однозначно продемонстрировано, что активность антранилатсинтетазы подавляется только триптофаном и никакие другие метаболиты клетки подобного действия не оказывают. Существует мнение, что регуляция по типу ретроингибирования является общим свойством клеточного метаболизма.

Более тщательное изучение механизма ингибирования активности фермента метаболитами этого же пути, проведенное в условиях *in vitro*, показало, что метаболит, являющийся ингибитором, специфически связывается с участком молекулы фермента, обладающим высокой степенью сродства к данному ингибитору и абсолютно отличающимся от активного центра фермента (т. е. не перекрывающимся с каталитическим центром). Этот участок получил название аллостерического центра (от греч. "аллос" – другой, "стерос" – пространственный), а сами ферменты, обладающие подобным центром, стали называться аллостерическими ферментами. Аллостерические ферменты представляют собой олигомеры, состоящие из взаимодействующих между собой нескольких одинаковых или различающихся субъединиц. При взаимодействии фермента с ингибитором конформация его молекулы изменяется, активный центр при этом также претерпевает изменения, приводящие к утрате каталитической способности фермента. При мутационном изменении аллостерического центра (центра взаимодействия с ингибитором) чувствительность к ингибитору утрачивается и фермент сохраняет свою активность, обеспечивая требуемый для синтеза конечного продукта этап биосинтетического пути.

Зная точно механизм регуляции синтеза интересующего продукта, участвует ли в регуляции механизм ретроингибирования, можно пытаться получить более активный продуцент данного соединения. Для отбора таких продуцентов используют структурные аналоги метаболитов, по отношению к которым селективируют резистентные варианты.

Например, 5-метилтриптофан, аналог триптофана, так же как и триптофан, ингибирует активность антранилатсинтетазы, но не заменяет собой триптофан в клеточном метаболизме, т. е. не способен включаться в клеточные белки без потери последними биологической активности.

Вследствие этого данный структурный аналог необходимого

метаболита задерживает рост бактерий, если он добавлен в питательную среду, Некоторые мутанты, устойчивые к ингибирующему действию 5-метилтриптофана, способны синтезировать значительные количества триптофана и выделять его во внешнюю среду, а антранилатсинтетаза у них оказывается нечувствительной к триптофану, т. е. не подвержена ретроингибированию этой аминокислотой. Такой методический прием часто используется в селекции продуцентов аминокислот, нуклеотидов и витаминов.

Если же необходимо добиться накопления (продукции) какого-нибудь промежуточного продукта биосинтетического пути, то следует получить мутант с заблокированным за этим продуктом этапом. Такой мутант будет зависимым от наличия в среде выращивания вещества, являющегося продуктом заблокированного этапа, либо конечного продукта данного биосинтетического пути.

Давно установлено, что из тысяч ферментов, синтезируемых растущими клетками, одни образуются постоянно и независимо от состава питательной среды, в то время как другие появляются лишь тогда, когда в среде присутствует субстрат их действия. Первые называются конститутивными ферментами (это ферменты гликолиза и др.), вторые относятся к адаптивным или индуцибельным ферментам. Так, клетки *E.coli*, растущие на среде с глюкозой, обладают следовыми количествами ферментов метаболизма лактозы, а также многих других источников углерода, которые способны усваивать клетки данного микроорганизма.

Но если эти же клетки перенести на среду с лактозой, являющейся в данном случае единственным источником углерода и энергии, то уже через 1–2 минуты можно зарегистрировать повышение активности β -галактозидазы, ключевого фермента в утилизации лактозы. Этот фермент гидролизует лактозу до глюкозы и галактозы. В течение следующего непродолжительного периода (равного 20–180 минутам) активность β -галактозидазы повышается примерно в 1000 раз по сравнению с исходным уровнем. Иными словами, имеет место выраженная индукция фермента, которая может быть определена следующим образом:

Индукция фермента – это относительное увеличение скорости его синтеза в ответ на появление в среде культивирования определенного химического соединения, называемого индуктором. Часто великолепными индукторами являются не утилизируемые аналоги субстратов. Например, для β -галактозидазы таким веществом служит изопропил- β – D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) неметаболизируемый аналог лактозы. С другой стороны, не всегда субстрат является индуктором синтеза соответствующего ему фермента. Так, лактоза, прежде чем выступить в роли индуктора, должна сначала превратиться в свой изомер аллолактозу (под действием β -галактозидазы).

Механизм генетической регуляции процесса индукции ферментов был расшифрован в экспериментах на кишечной палочке при изучении синтеза упоминавшегося фермента утилизации лактозы- β -галактозидазы.

В 1961 г. F. Jacob и J. Monod на основании результатов генетического и биохимического изучения процесса утилизации лактозы бактериями *E. coli K 12* сформулировали концепцию, получившую широкую известность как "модель оперона". В соответствии с этой моделью данная система регуляции состоит из четырех компонентов: структурных генов (детерминирующих структуру ферментов), гена-регулятора, оператора и промотора. Ген-регулятор определяет структуру белка-репрессора, способного связываться с оператором, который, в свою очередь, контролирует функционирование прилежащих к нему структурных генов.

Промотор представляет собой область для связывания с ферментом транскрипции – РНК-полимеразой. Если белок-репрессор связан с **оператором**, то РНК-полимераза не может перемещаться на промотер и синтез информационной РНК не может осуществляться. Результатом является отсутствие синтеза соответствующих ферментов. Первым из подробно изученных оперонов является лактозный оперон кишечной палочки. Авторы концепции предположили, что репрессор является аллостерическим белком, обладающим двумя специфическими центрами, один из которых характеризуется сродством к нуклеотидной последовательности области оператора, а другой – к молекуле индуктора.

Взаимодействие индуктора с репрессором снижает сродство последнего (вследствие изменения центра связывания с оператором) к оператору, результатом чего является освобождение оператора. Репрессор *lac*-оперона выделен в чистом виде и состоит из четырех идентичных субъединиц (общая молекулярная масса равна 150 000 дальтон). Каждая субъединица взаимодействует с одной молекулой индуктора (т. е. требуется четыре молекулы индуктора, чтобы инактивировать репрессор).

Репрессор в чистом виде характеризуется исключительно высоким сродством к оператору и эффективно связывается с нуклеотидной последовательностью *lac*-оператора в условиях *in vitro*. В присутствии индуктора связывание нарушается. Изложенные результаты выполненных экспериментов являются веским подтверждением гипотезы Jacob и Monod, которая в настоящее время считается полностью доказанной.

Известно, что мутации в последовательностях гена-регулятора или оператора приводят в определенных случаях к нарушению либо образования полноценного репрессора, либо к нарушению его сродства к оператору. И в том, и в другом случае потребность в индукторе для запуска синтеза информационной РНК, а следовательно, и соответствующих ферментов, исчезает. Подобные мутанты (или мутации) называются конститутивными, поскольку синтез ферментов осуществляется постоянно. Получение конститутивных мутантов имеет важное значение в селекции определенных штаммов промышленных микроорганизмов.

Концепция оперона применима и к процессу репрессии ферментов. Отличием от индуцибельных систем в данном случае является наличие в таких оперонах не активного репрессора (апорепрессора), который в одиночку не способен взаимодействовать с оператором, но может

активироваться конечным продуктом (корепрессором) с образованием активного репрессора.

Уже отмечалось, что с помощью аналога триптофана (5-метилтриптофана) можно получить устойчивые к ингибирующему действию триптофана мутанты, характеризующиеся повышенной продукцией данной аминокислоты. У некоторых из этих мутантов нарушен процесс ретроингибирования антранилатсинтетазы; у других – координированно дерепрессированы ферменты пути биосинтеза триптофана (т. е. ферменты триптофанового оперона). Генетический анализ показал, что у таких мутантов поврежден ген-регулятор, располагающийся на значительном расстоянии от контролируемых им генов триптофанового оперона. Такие мутанты являются конститутивными вследствие либо полного отсутствия репрессора, либо в результате невозможности последнего активироваться триптофаном.

Таким образом, изменяя регуляцию индуцибельных и репрессибельных оперонов, существует возможность повышать продукционную активность определенных промышленных штаммов-продуцентов. Уместно отметить, что структурные гены одного метаболического пути не всегда объединены в единый оперон (наподобие лактозного), однако это не мешает их регуляции с помощью индукции или репрессии. Так, например, гены *E.coli*, детерминирующие структуру ферментов, обеспечивающих биосинтез аргинина, располагаются в различных областях хромосомы, но все контролируются одним и тем же геном-регулятором. Такая система образует регулон. Другим показательным примером является SOS-регулон, гены которого детерминируют структуру более десятка различных белков и ферментов, участвующих в репарации повреждений ДНК клетки. Все эти структурные гены регулируются одним репрессором – продуктом гена *lexA*. Опероны и регулоны, контролирующие взаимосвязанные физиологические функции обнаружены у всех генетически изученных видов бактерий.

Очень важным регуляторным элементом любого оперона является область ДНК, именуемая промотором. Этот участок оперона обеспечивает взаимодействие (связывание) с РНК-полимеразой для начала транскрипции (т. е. синтеза молекулы информационной РНК). От особенностей промотора зависит эффективность транскрипции. Мутации в области промотора, изменяя его активность, могут повышать или понижать экспрессию оперона. Данное свойство промоторов также используется в создании более активных продуцентов.

Большие перспективы в селекции продуцентов открывает **генетическая инженерия**, методы которой позволяют заменять регуляторные области катаболических оперонов на более эффективные промоторы, повышающие продукцию клетками биологически активных веществ и обеспечивающие новые возможности контроля активности генов.

Само собой разумеется, что это не единственные способы повышения продуктивности бактерий за счет изменения регуляторных механизмов.

12. ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ

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.

Согласно определению Национального Института Здоровья (NIH) США, «рекомбинантными ДНК называют молекулы ДНК, полученные вне живой клетки путем соединения природных или синтетических фрагментов ДНК с молекулами, способными реплицироваться в клетке».

Молекула рекомбинантной ДНК представляет собой соединенные вне клетки два компонента:

- вектор, обеспечивающий механизм репликации и экспрессии;
- фрагмент клонируемой (чужеродной) ДНК, содержащие интересующие исследователя генетические элементы.

Наиболее важные методы биотехнологии рекомбинантных ДНК:

- специфическое расщепление ДНК рестрикцирующими нуклеазами, что ускоряет выделение различных генов и манипуляции с ними;
- быстрое секвенирование (установление последовательностей азотистых оснований в ДНК) всех нуклеотидов в очищенном фрагменте ДНК, для определения точных границ гена и кодируемой аминокислотной последовательности полипептида;
- гибридизацию нуклеиновых кислот, с большой точностью выявляющую специфические нуклеотидные последовательности на основе их способности связывать комплементарные основания;
- клонирование ДНК – суть сводится к введению ДНК-фрагмента в самореплицирующийся генетический аппарат (плазмиду или вирус), который используют для трансформации бактерий. Бактериальная клетка после этого способна воспроизводить этот фрагмент во многих миллионах идентичных копий;
- генетическую инженерию, позволяющую получать модифицированные версии генов и затем внедрять их в клетки или организмы.

После того, как рекомбинантная ДНК синтезирована, ее вводят в живые клетки. Но она неспособна к самовоспроизведению, ее разрушают внутриклеточные нуклеазы. 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.

Молекулы ДНК, способные акцептировать чужеродную ДНК и автономно реплицироваться, называют векторными молекулами. К числу

векторов относят плазмиды, бактериофаги, вирусы животных.

Биотехнология рекомбинантных белков охватывает производство:

- гормонов (инсулина);
- вакцин (против гепатита В);
- пептидных факторов роста тканей;
- рекомбинантных интерферонов (они представляют неспецифическую защиту клетки от вирусов и злокачественных образований).

На первом месте среди них по значению стоит рекомбинантный инсулин, составляющий около 30% от всего рынка рекомбинантной продукции.

Используемые в производстве рекомбинантных белков микроорганизмы, вносящие чужеродные гены, должны удовлетворять следующему:

1. Метаболизм микроорганизма должен быть хорошо изучен, поэтому в качестве продуцентов рекомбинантных белков используют *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisie*.

2. Микроорганизмы непатогенные.

3. Интенсивное размножение в условиях ферментера.

4. Способность микроорганизма секретировать чужеродный белок в среду. Можно ввести в клетку реципиента ген синтеза рекомбинантного белка с дополнительной аминокислотной последовательностью из гидрофобных аминокислот для перетаскивания белка в липидную мембрану, где с помощью сигнальных протеаз эта последовательность отщепляется и образуется целевой продукт – рекомбинантный белок, выходящий в среду.

5. Возможность сделать клетки микроорганизмов компетентными, чтобы их клеточная стенка была проницаема для плазмид.

Правила работы с рекомбинантными микроорганизмами:

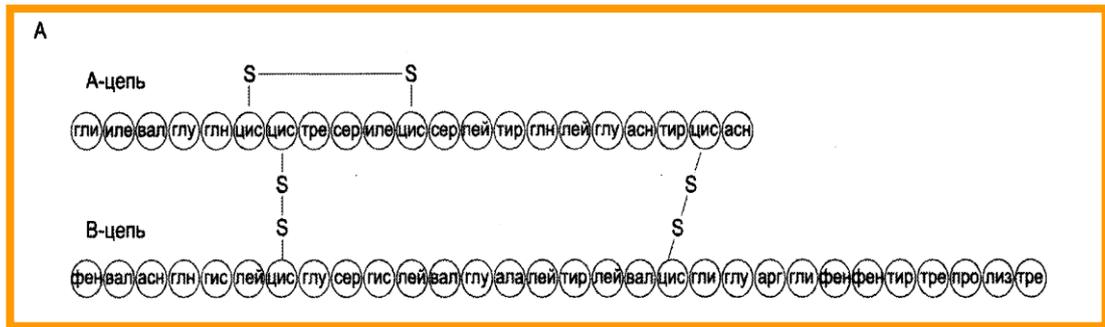
1. Системы выброса оснащаются фильтрами, задерживающими микробные клетки.

2. После завершения процесса производится стерилизация оборудования, но не должно быть разъедания (коррозия) его материалов.

3. В ферментере понижается давление на несколько миллиметров ртутного столба.

4. В клетку продуцента вставляют генетический дефект – путем делеции избирательно удаляют гены энзимов синтеза какой-либо аминокислоты, витамина. Такой микроорганизм более капризен и уязвим при изменениях среды и нежизнеспособен. В среде обязательно наличие именно тех аминокислоты или витамина, иначе блокируется размножение микроорганизма и образование целевого продукта.

Инсулин (127 а.о. → 84 а.о. → 51 а.о.) С-пептид отщепляется под действием протеиназ.



До внедрения в промышленность метода получения инсулина с использованием рекомбинантных микроорганизмов инсулин получали из поджелудочных желез крупного рогатого скота и свиней.

Инсулин крупного рогатого скота отличается от инсулина человека на 3 аминокислотных остатка, а инсулин свиньи только на один аминокислотный остаток, т.е. он ближе к человеческому инсулину. Тем не менее, при введении белков, отличающихся по структуре от белков человека даже так незначительно, возможно возникновение аллергических реакций.

Такой инсулин, как чужеродный белок, может также инактивироваться в крови образующимися антителами.

Кроме того, для получения 1 кг инсулина требуется 35 тысяч голов свиней (если известно, что годовая потребность в инсулине – 1 тонна препарата), а биосинтетически можно получить такое же количество инсулина при биосинтезе в 25 м³ ферментере, используя рекомбинантный штамм *Escherichia coli*.

Схема получения рекомбинантного инсулина (фирма Eli Lilly/Эли-Лилли, США):

1 этап. Путем химического синтеза созданы последовательности нуклеотидов, которые кодируют образование А и В цепей (синтетические гены).

2 этап. Каждый из синтетических генов вводят в плазмиды (в одну плазмиду вводят ген синтеза цепи А, в другую плазмиду – ген синтеза цепи В).

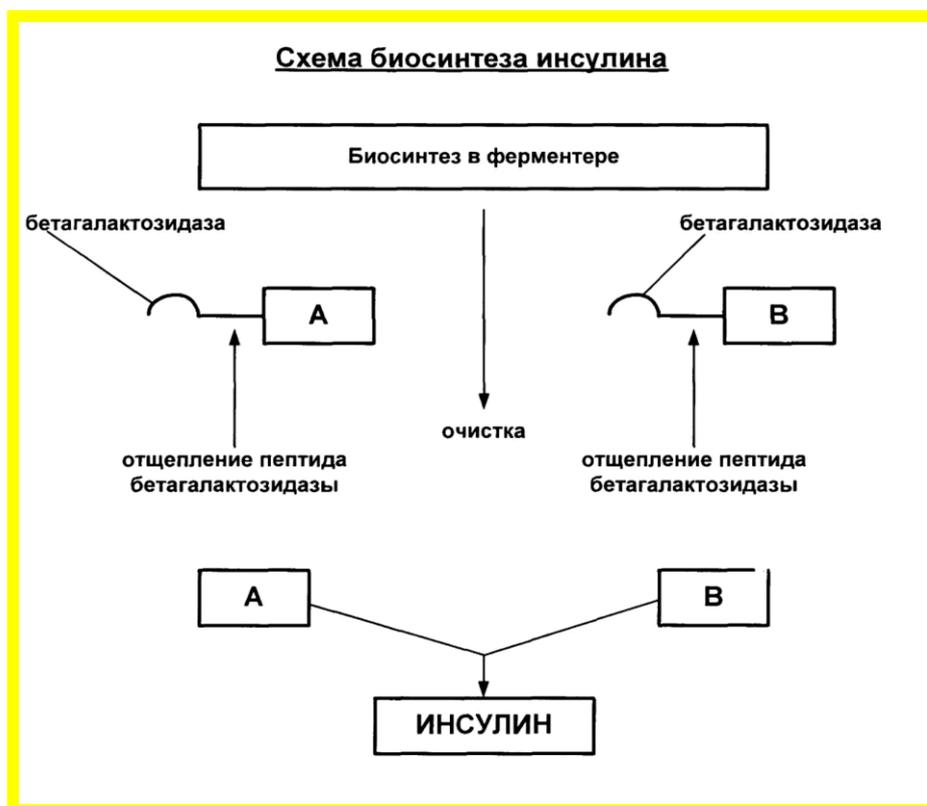
3 этап. Вводят ген, кодирующий синтез фермента β-галактозидазы. Этот ген включают в каждую плазмиду для того, чтобы добиться бурной репликации плазмид.

4 этап. Вводят плазмиды в клетку *Escherichia coli* – получают две культуры продуцента, одна культура синтезирует А-цепь, вторая – В-цепь.

5 этап. Помещают две культуры в ферментер. В среду добавляют галактозу для индукции синтеза β-галактозидазы. Плазмиды активно реплицируются, образуя много копий плазмид – много генов синтеза А и В цепей.

6 этап. Клетки лизируют, выделяют А и В цепи, которые связаны с β-галактозидазой. Обрабатывают бромцианом и отщепляют А и В-цепи от галактозидазы. Затем производят дальнейшую очистку и выделение А и В цепей.

7 этап. Окисляют остатки цистеина, связывают их и получают инсулин.



Инсулин, полученный этим путем является человеческим инсулином по своей структуре. Применение современных методов очистки исключает наличие в инсулине эндотоксинов и пирогенных примесей.

Интерфероны – группа белков, вырабатываемых клетками, при вирусной инфекции. Интерфероны индуцируют противовирусные реакции.

Виды интерферонов:

α -группа – лейкоцитарный интерферон;

β -группа – интерфероны фибробластов;

γ -группа – иммунный интерферон, Т-лимфоциты.

Интерфероны	Система	
	индуктор	клетки-продуценты
лейкоцитарный- α	вирус	лейкоциты периферической крови
лимфобластный- α	—"	В-лимфоциты
фибробластный- β	—"	фибробласты
иммунный- γ	митоген	лейкоциты периферической крови или Т-лимфоциты
	специфический антиген	лимфоциты

Интерфероны обычно получают из донорской крови человека, хотя в настоящее время уже применяют генно-инженерные способы их получения.

Методом генной инженерии получают также **реаферон** (рекомбинантный $\alpha 2$ -интерферон).

Ген человеческого $\alpha 2$ -интерферона включают в штамм *Pseudomonas aeruginosa*.

Ген человеческого лейкоцитарного интерферона (человеческий интерферон состоит из 150 а.о.) был получен синтетическим путем.

Его включают в плазмиду *Escherichia coli*, или в дрожжи.

Этапы на примере получения α -IFN

1. Суспензию лейкоцитарных клеток из крови доноров обрабатывают вирусом, оказывающим индуцирующий эффект на биосинтез IFN (н-р, вирусом Сендай).

2. Из лейкоцитов получают м-РНК, программирующую биосинтез интерферона, при этом концентрация м-РНК в индуцированных лейкоцитах $\leq 0,1\%$.

3. С помощью обратной транскриптазы (ревертазы) на полинуклеотидной основе м-РНК синтезируют комплементарную одноцепочечную копию ДНК.

4. Эукариотический ген в условиях *in vitro* перестраивают, удаляя рестриктазой часть нуклеотидов, кодирующих ненужную информацию.

5. Созданный ген переносят в плазмиду, где он совмещается с бактериальным промотором, а затем вводится в бактериальную клетку-хозяин.

Так создан штамм-продуцент *E. coli*, синтезирующий IFN в высоких концентрациях.

В 1 л полученной бактериальной суспензии содержится около 5 мг (0,20-0,25 мг) α -IFN, что в $5 \cdot 10^3$ раз больше того количества, которое можно получить из 1 л донорской крови.

Можно получать используя *Bac. subtilis* (экскретирует белок в культуральную жидкость);

Sacch. cerevisiae (растет на дешевых субстратах, устойчив к фагам, легко отделяется биомасса, в клетках идет процессинг преинтерферона); *Methylomonas*, *Pseudomonas*, *Salmonella*.

Все конститутивно синтезируют интерферон идентичный природному.

В **1986** году на рынок вышел первый интерферон, разработанный компанией «Биоген» и доведенный до регистрации и производства компанией Schering-Plough.

В России интерферон был разработан и зарегистрирован в **2005** году компанией «Биокад», ныне признанным лидером российской биофармацевтики.

Гормон роста человека (соматотропин) состоит из 191 а.о., синтезируется в передней доле гипофиза, видоспецифичен, т.е. можно применять только человеческий гормон. Он оказывает анаболическое действие, вызывая увеличение роста и массы тела человека при карликовости, связанной с его недостаточностью. Ген соматотропина включают в *Escherichia coli*, или в клетки дрожжей.

Пептидные гормоны сейчас практически целиком производятся путем синтеза с помощью генетически модифицированных микроорганизмов.

Сюда можно отнести также такие иммуномодулирующие агенты, как

интерлейкины.

Филграстим, или гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, впервые выпущен в США в 1991 г. компанией AMGen, гигантом и лидером мировой «биофармы». Препарат нейпоген (торговое название филграстима) вместе с эритро-поэтином (зарегистрирован в 1989 г.) обеспечили рекордную скорость роста компании AMGen. В России первый биоаналог филграстима (Г-КСФ) зарегистрирован и выведен на рынок в 2007 компанией «Биокад».

С помощью данных методов в *Escherichia coli* достигнута экспрессия порядка 70 протеинов высших эукариот: соматостатина, инсулина, энкефалина, протеин-киназы вируса саркомы Рауса, гормона роста человека, интерферона фибробластов человека, лейко-цитарного интерферона, антигена вируса гепатита В, химозина, гормона роста быка и т.п. С помощью методов биотехнологии можно из 1 л культуры ткани получить порядка 10⁸ ед. интерферона, в то время как 1 л культуры *E. coli* позволяет получить 10¹⁰ ед. рекомбинантного интерферона.

E. coli;

Bacillus spp.;

Erwinia spp.;

Pseudomonas spp.;

Rhizobium spp.;

Saccharomyces cerevisiae;

Pichia pastoris и др.

Достоинства *E. coli*:

- потенциально очень высокие уровни экспрессии;
- низкая стоимость;
- простота условий культивирования;
- быстрый рост;
- возможность измерения;
- простое преобразование протоколов;
- возможность изменения многих параметров с целью оптимизации экспрессии;
- отсутствие эндотоксинов.

Данная система экспрессии рекомбинантных белков имеет и ряд **недостатков:**

- неэффективное формирование дисульфидных связей;
- возможность нарушения формирования белков в цитоплазме, включая конформацию;
- неэффективность рефолдинга в условиях *in vitro*;
- отличие кодонов от соответствующих эукариотических;
- минимальные посттрансляционные модификации.

Несмотря на отсутствие посттрансляционных модификаций и необходимость удаления эндотоксина из белков, экспрессированных в клетках *E. coli*, перед их использованием *in vivo*, данная бактериальная система очень

популярна для эксп-рессии рекомбинантных фармацев-тических белковых препаратов. Так, в 2009 г. 29,8% таких препаратов, одобренных FDA/ЕМЕА, были произведены именно в клетках *E. coli*.

Основными производителями бактериальных систем экспрессии на основе *E. coli*, являются:

- Invitrogen/ Life Technologies (США);
- EMD Millipore (США);
- New England Biolabs (США);
- Promega (США);
- Clontech (США).

Преимущества дрожжей *S.cerevisiae* как продуцентов рекомбинантных белков:

- хорошие уровни экспрессии;
- возможность выбора между секре-тируемой и клеточной экспрессией;
- экономическая доступность;
- простота и доступность условий культивирования;
- возможность измерения;
- способность реализовывать боль-шинство эукариотических посттран-сляционных модификаций;
- эффективная укладка белков;
- отсутствие эндотоксинов.

Экспрессионным системам на основе дрожжей *S. cerevisiae* присущи и **недостатки:**

- более низкая экспрессия по сравнению с *Pichia pastoris*;
- ограниченная секреторная способность в сравнении с клетками *P. pastoris*;
- гликозилирование протекает разнона-правленно в разных клетках млекопи-тающих;
- тенденция к гипергликозилированию белков;
- N-гликановые структуры считаются аллергенными;
- невозможность высокоплотного культивирования.

Помимо *S. cerevisiae*, в качестве систем экспрессии для рекомбинантных белков используются и другие виды дрожжей – *Pichia pastoris*, *Hanensula polymorpha*, *Yarrowia lypolytica*, *Kluuveromyces lactis* и *Schizosaccharomyces pombe*. При этом продукция белков в дрожжах мо-жет достигать 6,4 г/л. Хотя, как пра-вило, она соответствует 100–200 мг/л. Однако, несмотря на эти ограни-чения, 43% рекомбинантных белков на современном фармацевтическом рын-ке производится в бактериях и дрожжах.

Основным производителем дрожжевой экспрессионной системы, сконструированной на основе *S. cerevisiae*, является Invitrogen/Life Technologies (США).

Основные преимущества дрожжей *P. pastoris* как экспрессионной системы для рекомбинантных белков:

- высокие уровни экспрессии;

- экономическая доступность;
- простота условий культивирования;
- относительно быстрый рост;
- возможность измерения;
- возможность выбора между секретиромемой или внутриклеточной экспрессией;
- эффективная секреция белка, позволяющая реализовать простую его очистку;
- широкие посттрансляционные модификации белков;
- эффективная укладка белков;
- N-гликозилирование, более сходное с гликозилированием у высших эукариот, чем у дрожжей *S. cerevisiae*;
- отсутствие эндотоксинов.

Недостатки экспрессионных систем на основе *P. pastoris*:

- использование метанола в качестве индуктора;
- разнонаправленное протекание реакции гликозилирования в клетках млекопитающих. Основным производителем систем экспрессии на основе *P. pastoris* является Invitrogen/Life Technologie (США).

Преимущества экспрессионной системы рекомбинантных белков на основе бакуловирусов и инфицированных клеток насекомых:

- хорошие уровни экспрессии (особенно для внутриклеточных белков);
- относительно быстрый рост;
- эффективная укладка белков;
- умеренный масштаб измерения;
- широкая посттрансляционная модификация белков;
- гликозилирование, как и в клетках млекопитающих;
- относительно легкое энзиматическое гликозилирование белков;
- отсутствие эндотоксинов.

Недостатки данной системы:

- дорогостоящая культуральная среда;
- большие объемы вируса, необходимые для расширения исследований;
- неэффективная обработка пропептидов в секреторном пути;
- гликозилирование различно в отношении клеток млекопитающих;
- вирусная инфекция приводит к лизису клеток и возможному ухудшению свойств экспрессируемых белков.

Основные производители экспрессионных систем на основе бакуловирусов и инфицированных клеток насекомых:

- Invitrogen/Life Technologies (США);
- Oxford Expression Technologies (Великобритания);
- BD Biosciences (США);
- Clontech (США).

Основные преимущества культур клеток млекопитающих для экспрессии рекомбинантных белков:

- хороший уровень экспрессии;

- умеренный масштаб измерения;
- удобство для исследований суспен-зионно адаптированных клеток;
- эффективная укладка белков;
- хорошо подходит для секретире-емых белков;
- все посттрансляционные модифи-кации;
- отсутствие эндотоксинов.

Недостатки экспрессионных систем на основе клеток млекопитающих:

- дорогостоящая культуральная среда;
- сложность условий культивирова-ния;
- сложность работы с культурами клеток;
- высокая стоимость целевого продукта.

Основными производителями таких систем экспрессии рекомбинатных белков являются:

- Invitrogen/Life Technologies (США);
- EMD Millipore (США);
- Promega (США);
- Stratagene (США).

13. БИОТЕХНОЛОГИЯ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ И ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ

Биотехнология и растениеводство. Культурные растения страдают от сорняков, грызунов, насекомых-вредителей, нематод, фитопатогенных грибов, бактерий, вирусов, неблагоприятных погодных и климатических условий. Перечисленные факторы наряду с почвенной эрозией и градом значительно снижают урожайность сельскохозяйственных растений. Известно, какие разрушительные последствия в картофелеводстве вызывает колорадский жук, а также гриб *Phytophthora* – возбудитель ранней гнили (фитофтороза) картофеля. Кукуруза подвержена опустошительным «набегам» южной листовой гнили, ущерб от которой в США в 1970 г. был оценен в 1 млрд. долларов.

В последние годы большое внимание уделяют вирусным заболеваниям растений. Наряду с болезнями, оставляющими видимые следы на культурных растениях (мозаичная болезнь табака и хлопчатника, зимняя болезнь томатов), вирусы вызывают скрытые инфекционные процессы, значительно снижающие урожайность сельскохозяйственных культур и ведущие к их вырождению (И. Г. Атабеков, 1984).

Биотехнологические пути защиты растений от рассмотренных вредоносных агентов включают:

- 1) выведение сортов растений, устойчивых к неблагоприятным факторам;
- 2) химические средства борьбы (пестициды) с сорняками (гербициды), грызунами (ратициды), насекомыми (инсектициды), нематодами (нематоциды), фитопатогенными грибами (фунгициды), бактериями, вирусами;
- 3) биологические средства борьбы с вредителями, использование их естественных врагов и паразитов, а также токсических продуктов, образуемых живыми организмами.

Наряду с защитой растений ставится задача повышения продуктивности сельскохозяйственных культур, их пищевой (кормовой) ценности, задача создания сортов растений, растущих на засоленных почвах, в засушливых и заболоченных районах. Разработки нацелены на повышение энергетической эффективности различных процессов в растительных тканях, начиная от поглощения кванта света и кончая ассимиляцией CO_2 и водно-солевым обменом.

Выведение новых сортов растений. Традиционные подходы к выведению новых сортов растений – это селекция на основе гибридизации, спонтанных и индуцированных мутаций. Методы селекции не столь отдаленного будущего включают генетическую и клеточную инженерию.

Генетическую инженерию предлагают использовать для выведения азотфиксирующих растений. В природных условиях азотфиксирующие клубеньковые бактерии, представители рода *Rhizobium*, вступают в симбиоз с бобовыми. Комплекс генов азотфиксации (*nif*) из этих или иных бактерий предлагают включить в геном злаковых культур. Трудности связаны с

поиском подходящего вектора, поскольку широко используемые для подобных целей *Agrobacterium* с плазмидами Ti и Ri не заселяют злаки. Планируют модификацию генома *Agrobacterium*, чтобы бактерия могла вступать в симбиоз со злаками и передавать им генетическую информацию. Другим решением проблемы могла бы быть трансформация растительных протопластов посредством ДНК-К компетенции клеточной инженерии относят создание новых азотфиксирующих симбиотических ассоциаций «растение – микроорганизм».

В настоящее время выделены и клонированы гены *sym*, отвечающие за установление симбиотических отношений между клубеньковыми азотфиксаторами и растением-хозяином. Путем переноса этих генов в свободноживущие азотфиксирующие бактерии (*Klebsiella*, *Azotobacter*) представляется возможным заставить их вступить в симбиоз с ценными сельскохозяйственными культурами. Методами генетической инженерии предполагают также повысить уровень обогащения почвы азотом, амплифицируя гены азотфиксации у *Klebsiella* и *Azotobacter*.

Разрабатываются подходы к межвидовому переносу генов *osm*, обуславливающих устойчивость растений к нехватке влаги, жаре, холоду, засоленности почвы. Перспективы повышения эффективности биоконверсии энергии света связаны с модификацией генов, отвечающих за световые и темновые стадии этого процесса, в первую очередь генов *sfh*, регулирующих фиксацию CO₂ растением. В этой связи представляют большой интерес

разработки по межвидовому переносу генов, кодирующих хлорофилл *a/ft*-связывающий белок и малую субъединицу рибулозо-бисфосфаткарбоксилазы – ключевого фермента в фотосинтетической фиксации CO₂.

Гены устойчивости к некоторым гербицидам, выделенные из бактерий и дрожжей, были успешно перенесены в растения табака. Разведение устойчивых к гербицидам растений открывает возможность их применения для уничтожения сорняков непосредственно на угодьях, занятых сельскохозяйственными культурами. Проблема состоит, однако, в том, что массивные дозы гербицидов могут оказаться вредными для природных экосистем.

Некоторые культурные растения сильно страдают от нематод. Обсуждается проект введения в растения новых генов, обуславливающих биосинтез и выделение нематоцидов корневыми клетками. Важно, чтобы эти нематоциды не проявляли токсичности по отношению к полезной прикорневой микрофлоре. Возможно также создание почвенных ассоциаций «растение – бактерия» или «растение – гриб (микориза)» так, чтобы бактериальный (грибной) компонент ассоциации отвечал за выделение нематоцидов.

Важное место в выведении новых сортов растений занимает метод культивирования растительных клеток *in vitro*. Регенерируемая из таких клеток «молодая поросль» состоит из идентичных по генофонду экземпляров, сохраняющих ценные качества избранного клеточного клона. В

Австралии из культивируемых *in vitro* клеточных клонов выращивают красные камедные деревья (австралийские эвкалипты), отличающиеся способностью расти на засоленных почвах. Предполагается, что корни этих растений будут выкачивать воду из таких почв и тем самым понижать уровень грунтовых вод. Это приведет к снижению засоленности поверхностных слоев почвы в результате переноса минеральных солей в более глубокие слои с потоками дождевой воды. В Малайзии из клеточного клона получена масличная пальма с повышенной устойчивостью к фитопатогенам и увеличенной способностью к образованию масла (прирост на 20-30%). Клонирование клеток с последующим их скринингом и регенерацией растений из отобранных клонов рассматривают как важный метод сохранения и улучшения древесных пород умеренных широт, в частности хвойных деревьев. Растения-регенеранты, выращенные из клеток или тканей меристемы, используют ныне для разведения спаржи, земляники, брюссельской и цветной капусты, гвоздик, папоротников, персиков, ананасов, бананов.

С клонированием клеток связывают надежды на устранение вирусных заболеваний растений. Разработаны методы, позволяющие получать регенеранты из тканей верхушечных почек растений. В дальнейшем среди регенерированных растений проводят отбор особей, выращенных из незараженных клеток, и выбраковку больных растений. Раннее выявление вирусного заболевания, необходимое для подобной выбраковки, может быть осуществлено методами иммунодиагностики, с использованием моноклональных антител или методом ДНК/РНК-проб. Предпосылкой для этого является получение очищенных препаратов соответствующих вирусов или их структурных компонентов.

Клонирование клеток – перспективный метод получения не только новых сортов, но и промышленно важных продуктов. При правильном подборе условий культивирования, в частности при оптимальном соотношении фитогормонов, изолированные клетки более продуктивны, чем целые растения. Имобилизация растительных клеток или протопластов нередко ведет к повышению их синтетической активности.

Коммерческое значение в основном имеет промышленное производство шиконина. Применение растительных клеток, которые являются высокоэффективными продуцентами алкалоидов, терпенов, различных пигментов и масел, пищевых ароматических добавок (земляничной, виноградной, ванильной, томатной, сельдереиной, спаржевой) наталкивается на определенные трудности, связанные с дороговизной используемых технологий, низким выходом целевых продуктов, длительностью производственного процесса.

Биодеградация пестицидов. Пестициды обладают мощным, но недостаточно избирательным действием. Так, гербициды, смываясь дождевыми потоками или почвенными водами на посевные площади, наносят ущерб сельскохозяйственным культурам. Помимо этого, некоторые пестициды длительно сохраняются в почве, что тоже приводит к потерям

урожая. Возможны разные подходы к решению проблемы:

- 1) усовершенствование технологии применения пестицидов, что не входит в компетенцию биотехнологии;
- 2) выведение растений, устойчивых к пестицидам;
- 3) биодеградация пестицидов в почве.

К разрушению многих пестицидов способна микрофлора почвы. Методами генетической инженерии сконструированы штаммы микроорганизмов с повышенной эффективностью биодеградации ядохимикатов, в частности штамм *Pseudomonas ceparia*, разрушающий 2, 4, 5-трихлорфеноксиацетат. Устойчивость того или иного пестицида в почве меняется при добавлении его в сочетании с другим пестицидом. Так, устойчивость гербицида хлорпрофама увеличивается при его внесении совместно с инсектицидами из группы метилкарбаматов. Оказалось, что метилкарбаматы ингибируют микробные ферменты, катализирующие гидролиз хлорпрофама.

Микробная трансформация пестицидов имеет и обратную сторону. Во-первых, быстрая деградация пестицидов сводит на нет их полезный эффект. Во-вторых, в результате микробного превращения могут образоваться продукты, сильно ядовитые для растений. При использовании гербицида тиобенкарба в Японии наблюдали подавление роста и развития риса. Установлено, что подавляет не сам гербицид, а его дехлорированное производное 5-бензил-1М-диэтилтиокарбамат. Чтобы предотвратить образование такого производного, тиобенкарб применяют в комбинации с метоксифеном, ингибитором дехлорирующего фермента микроорганизмов.

Биологическая защита растений от вредителей и патогенов. Из широкого спектра биологических средств защиты растений ограничимся рассмотрением средств борьбы с насекомыми-вредителями и патогенными микроорганизмами. Именно в этих областях имеются наибольшие перспективы.

К традиционным биологическим средствам, направленным против насекомых, принадлежат хищные насекомые. В последние годы арсенал «оружия» инсектицидного действия пополнен грибами, бактериями, вирусами, патогенными для насекомых (энтомопатогенными). Многие виды насекомых-вредителей (тля, колорадский жук, яблоневая плодоярка, озимая совка и др.) восприимчивы к заболеванию, вызываемому грибом *Beauveria bassiana*. Препарат боверин из лиофильно высушенных конидий гриба сохраняет энтомопатогенность в течение года после обработки почвы или растений. Препарат пецилолин из гриба *Poecilomyces fumosoroseus* применяют для борьбы с вредителями кустарников, например смородины.

Важным источником бактериальных энтомопатогенных препаратов служит *Bacillus thuringiensis*. Эти препараты обладают высокой устойчивостью и патогенны для нескольких сотен видов насекомых-вредителей, в том числе для листогрызущих насекомых – вредителей яблонь, винограда, капусты, лесных деревьев. Гены, отвечающие за синтез одного из токсинов *B. thuringiensis*, были изолированы и перенесены в растения табака.

Необходимо, чтобы такие «энтомопатогенные» растения не содержали веществ, токсичных для человека и животных.

Вирусные препараты отличаются высокой специфичностью действия, длительным (до 10-15 лет) сохранением активности, устойчивостью к колебаниям температуры и влажности. Из многих сотен известных энтомопатогенных вирусов наибольшее применение находят вирусы ядерного полиэдроза, обладающие высокой эффективностью действия на насекомых-вредителей. Насекомых выращивают в искусственных условиях, заражают вирусом, из гомогенатов погибших насекомых готовят препараты. Применяют отечественные препараты вирина-ЭКС (против капустной совки), вирина-ЭНШ (против непарного шелкопряда). В последние годы для культивирования вирусов широко применяют культуры клеток насекомых.

Комбинация из нескольких биологических средств нередко действует на вредителей более эффективно, чем каждый в отдельности. Смертность соснового шелкопряда резко возрастает, если вирус цитоплазматического полиэдроза применяют в сочетании с препаратами из *Bac. thuringiensis*. Эффективна комбинация биологических и химических средств защиты растений от насекомых.

Среди новых средств защиты растений – вещества биогенного происхождения, ингибирующие откладку яиц насекомыми или стимулирующие активность естественных врагов насекомых-вредителей: хищников, паразитов.

Разнообразны средства защиты растений от фитопатогенных микроорганизмов.

1. **Антибиотики.** Примерами могут служить триходермин и трихотецин, продуцируемые грибами *Trichoderma sp.* и *Trichotecium roseum*. Эти антибиотики используются для борьбы с корневыми гнилями овощных, зерновых и технических культур.

2. **Фитоалексины**, естественные растительные агенты, инактивирующие микробных возбудителей заболеваний. Эти соединения, синтезируемые в тканях растений в ответ на внедрение фитопатогенов, могут служить высокоспецифичными заменителями пестицидов. Фитоалексин перца успешно применяли при фитофторозе. Могут быть использованы также вещества, стимулирующие синтез фитоалексинов в растительных тканях.

3. Использование **микробов-антагонистов**, вытесняющих патогенный вид и подавляющих его развитие.

4. **Иммунизация и вакцинация растений.** Вакцинные препараты стремятся вводить непосредственно в прорастающие семена.

5. **Введение в ткани растений специфического агента** (d-фактора), снижающего жизнеспособность возбудителя.

Биологические средства – важная составная часть комплексной программы защиты растений. Эта программа предусматривает проведение защитных мероприятий агротехнического, биологического и химического плана наряду с использованием устойчивых сортов растений. Задачей

комплексной программы является поддержание численности вредителей растений на экологически сбалансированном уровне, не наносящем ощутимого вреда культурным растениям.

Биологические удобрения. Биологические (бактериальные) удобрения применяют для обогащения почвы связанным азотом. Большое распространение получили препараты нитрагин и азотобактерин – клетки клубеньковых бактерий и азотобактера, к которым добавляют стабилизаторы (мелассу, тиомочевину) и наполнитель (бентонит, почву). Азотобактерин обогащает почву не только азотом, но и витаминами и фитогормонами, гиббереллинами и гетероауксинами. Препарат фосфобактерин из *Bacillus megaterium* превращает сложные органические соединения фосфора в простые, легко усвояемые растениями. Фосфобактерин также обогащает почву витаминами и улучшает азотное питание растений.

Растения синтезируют ряд соединений, регулирующих их рост и развитие (фитогормоны, биорегуляторы). К их числу принадлежат ауксины, гиббереллины, цитокинины. Созревание плодов стимулирует этилен. Эти биорегуляторы находят применение в сельском хозяйстве. К числу новых, обнаруженных в последние годы биорегуляторов относят пептиды, имеются перспективы их применения в сельском хозяйстве.

Биотехнология и животноводство. Большое значение в связи с интенсификацией животноводства отводится профилактике инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных с применением рекомбинантных живых вакцин и генноинженерных вакцин-антигенов, ранней диагностике этих заболеваний с помощью моноклональных антител и ДНК/РНК-проб.

Для повышения продуктивности животных нужен полноценный корм. Микробиологическая промышленность выпускает кормовой белок на базе различных микроорганизмов – бактерий, грибов, дрожжей, водорослей. Богатая белками биомасса одноклеточных организмов с высокой эффективностью усваивается сельскохозяйственными животными. Так, 1 т кормовых дрожжей позволяет получить 0,4-0,6 т свинины, до 1,5 т мяса птиц, 25-30 тыс. яиц и сэкономить 5-7 т зерна. Это имеет большое народнохозяйственное значение, поскольку 80% площадей сельскохозяйственных угодий в мире отводятся для производства корма скоту и птице.

Одноклеточные организмы характеризуются высоким содержанием белка – от 40 до 80% и более. Белок одноклеточных богат лизином, незаменимой аминокислотой, определяющей его кормовую ценность. Добавка биомассы одноклеточных к недостаточным по лизину растительным кормам позволяет приблизить их аминокислотный состав к оптимальному. Недостатком биомассы одноклеточных является нехватка серусодержащих аминокислот, в первую очередь метионина. У одноклеточных его приблизительно вдвое меньше, чем в рыбной муке. Этот недостаток присущ и таким традиционным белковым кормам, как соевая мука. Питательная

ценность биомассы одноклеточных может быть значительно повышена добавкой синтетического метионина.

Производство кормового белка на основе одноклеточных – процесс, не требующий посевных площадей, не зависящий от климатических и погодных условий. Он может быть осуществлен в непрерывном и автоматизированном режиме.

В нашей стране производится биомасса одноклеточных, в особенности на базе углеводородного сырья. Достигнутые успехи не должны заслонять проблемы, возникающей при использовании углеводородов как субстратов для крупномасштабного производства белка, – ограниченность их ресурсов. Важнейшими альтернативными субстратами служит метанол, этанол, углеводы растительного происхождения, в перспективе водород.

Очищенный этанол на мировом рынке стоит почти вдвое дороже метанола, но этанол отличается очень высокой эффективностью биоконверсии. Из 1 кг этанола можно получить до 880 г дрожжевой массы, а из 1 кг метанола – до 440 г. Биомасса из этанола особенно богата лизином – до 7%.

Большое значение для животноводства имеет обогащение растительных кормов микробным белком. Для этого широко применяют твердофазные процессы.

Перспективными источниками белка представляются фототрофные микроорганизмы, в особенности цианобактерии рода *Spirulina* и зеленые одноклеточные водоросли из родов *Chlorella* и *Scenedesmus*. Наряду с обычными аппаратами для их выращивания используют искусственные водоемы. Добавление к растительным кормам биомассы *Scenedesmus* позволяет резко повысить эффективность усвоения белков животными.

Таким образом, существуют разнообразные источники сырья для получения биомассы одноклеточных. Некоторые субстраты (этанол) дают столь высококачественный белок, что он может быть рекомендован в пищу. Цианобактерии рода *Spirulirita* издавна используют в пищу ацтеки в Центральной Америке и племена, обитающие на озере Чад в Африке.

Технологическая биоэнергетика

Технологическая биоэнергетика – одно из направлений биотехнологии, связанное с эффективным использованием энергии, запасаемой при фотосинтезе. Это может быть достигнуто путем:

1) превращения биомассы, накопленной в результате фотосинтеза в дешевое и высококалорийное топливо – метан и другие углеводороды, этанол и т. д.;

2), модификации самого процесса фотосинтеза, в результате которой энергия света с максимальной эффективностью используется на образование водорода или другого топлива, минуя стадию фотоассимиляции CO_2 и синтеза компонентов клетки. На уровне теоретических разработок находится идея непосредственного преобразования энергии Солнца в электрическую (биофотоэлектрические преобразователи энергии).

Рассмотрим вначале путь, пролегающий через использование биомассы, в первую очередь, растительной, ресурсы которой в мире огромны и оцениваются в 100 млрд, т по сухому веществу в год. Лишь незначительная часть ее расходуется человечеством, но и эта часть дает до 14% потребляемой в мире энергии. Биомасса – не только возобновляемый и почти даровой источник энергии, но и альтернатива тающим запасам полезных ископаемых.

ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ

Развитие молекулярной генетики, позволяющей целенаправленно нарабатывать ДНК как носителя генетической информации, открывает животноводству новые перспективы. Применение методов генной инженерии в животноводстве дает основание прогнозировать, что традиционные методы разведения животных будут дополнены и даже заменены новыми технологиями.

Животных, несущих в своем геноме рекомбинантный (чужеродный) ген, определяют как трансгенных, а интегрировавшийся в геном реципиента ген – как трансген. Продукт этого гена – белок – является трансгенным продуктом.

С помощью переноса генов при синтезе рекомбинантных белков можно добиться изменения некоторых свойств организма, придать ему новые качества. При передаче трансгена по наследству потомству возможно создание трансгенных линий животных.

Создание и выделение трансгенов, их клонирование являются объектом исследований генных инженеров, и поэтому эти вопросы не рассматриваются в данном учебном пособии.

После выбора и приобретения необходимой генной конструкции получение трансгенных сельскохозяйственных животных можно разделить на следующие этапы.

Приготовление раствора ДНК для микроинъекции.

Подготовка доноров и извлечение эмбрионов.

Визуализация пронуклеусов в эмбрионах сельскохозяйственных животных и микроинъекция ДНК.

Пересадка инъецированных эмбрионов в яйцеводы или (после промежуточного культивирования) в матку синхронизированных реципиентов.

Доказательство интеграции у родившихся потоков и, если возможно, первое исследование экспрессии трансгена на уровне транскрипции (РНК) и трансляции (протеин).

Получение трансгенных потомков с использованием методов традиционного животноводства.

Приготовление раствора ДНК для микроинъекций. В растворе ДНК для микроинъекции должны отсутствовать механические примеси, которые могут вызвать закупоривание инъекционной пипетки или повреждение инъецируемых клеток. Растворы, соприкасающиеся с ДНК, предварительно

стерилизуют, а посуду тщательно промывают. Конечную концентрацию ДНК устанавливают таким образом, чтобы в 1 пкл инъекционного раствора содержалось более 100 копий генной конструкции. Обычно используют раствор с концентрацией 1000 копий в 1 пкл. Для фрагментов ДНК длиной от 5 до 8 кб в 1 мл содержатся 100 копий при концентрации 1-2 мкг/мл. Связь между количеством инъецируемой ДНК и числом интегрировавшихся копий не обнаружена. Готовый для инъекции раствор ДНК хранят в замороженном состоянии.

Частота интеграции при получении трансгенных животных методом микроинъекции зависит от следующих факторов: очистки инъекционного раствора; формы ДНК (кольцевая, линейная); вида концов (тупые или неравные); концентрации ДНК; буферного раствора.

Таким образом, уже от приготовления инъекционного раствора зависит эффективность получения трансгенных животных.

Подготовка доноров и извлечение эмбрионов. При получении трансгенных животных исследователи стремятся к тому, чтобы все соматические и особенно генеративные клетки содержали генную конструкцию. Поэтому гены транспортируют на ранних стадиях развития животного: в большинстве случаев на стадии зиготы или 2-клеточных эмбрионов.

Для получения большого числа эмбрионов вызывают суперовуляцию у доноров, после чего их спаривают или осеменяют.

Визуализация пронуклеусов в эмбрионах сельскохозяйственных животных и микроинъекция ДНК. Для введения генов в геном животного в настоящее время используют три основных метода:

- микроинъекция ДНК в пронуклеус зигот или в каждый бластомер у 2-клеточного эмбриона;
- введение ДНК с использованием ретровирусных векторов;
- получение трансгенных химер из генетически трансформированных клеток и эмбрионов.

Наиболее распространен метод микроинъекции ДНК. Два других метода имеют ряд ограничений и пока не нашли применения на сельскохозяйственных животных.

Для микроинъекции эмбрионов необходим устойчивый стол, на котором устанавливают инвертированный микроскоп, два микроманипулятора для управления удерживающей и инъекционной пипетками и прибор для регулирования инъекционного давления. На столике микроскопа устанавливают инъекционную камеру со средой, покрытой парафиновым маслом. В среду помещают эмбрионы. Эмбрионы фиксируют посредством пониженного давления на удерживающей пипетке так, чтобы инъецируемый пронуклеус был хорошо виден. Кончик инъекционной пипетки (внутренний диаметр около 1 мкм) наполняют раствором ДНК. Пипетку вводят в пронуклеус через прозрачную оболочку и клеточную

мембрану и затем инъецируют 1-2 пкл раствора ДНК. О точности операции судят по набуханию пронуклеуса. Увеличение объема пронуклеуса свидетельствует о том, что раствор ДНК действительно введен. После инъекции эмбрионы освобождают от удерживающей пипетки и культивируют до момента пересадки реципиентам.

В оплодотворенных яйцеклетках мыши и кролика, извлеченных в соответствии со стадией их развития, пронуклеусы очень хорошо видны и могут быть легко инъецированы. У эмбрионов сельскохозяйственных животных в цитоплазме имеются темные липидосодержащие гранулы, которые затрудняют визуализацию пронуклеусов. В результате центрифугирования при 15000 г/мин в течение 3-5 мин гранулы смещаются к одному полюсу яйцеклетки, а лежащие недалеко от центра пронуклеусы становятся видимыми и доступными для микроинъекций. Для эмбрионов овцы, как правило, не требуется центрифугирования: для визуализации пронуклеусов достаточно применить оптику Номарского с интерференционным контрастом. Несмотря на сложную обработку (центрифугирование), микроинъекция эмбрионов сельскохозяйственных животных все же сложнее и не может быть выполнена с такой же надежностью и эффективностью, как у мышей и кроликов.

Пересадка эмбрионов. После кратковременного культивирования *in vitro* проинъецированные эмбрионы хирургическим путем переносят в яйцеводы синхронизированных реципиентов.

Синхронизация охоты у реципиентов и доноров, от которых получают эмбрионы, является необходимым условием для успешного выполнения программы по переносу генов (эмбрионов), так как яичники, яйцеводы и матка должны находиться в соответствующей стадии, чтобы физиологически обеспечить дальнейшее развитие пересаженных эмбрионов.

Каждому реципиенту мыши, кролика и свиньи пересаживают 20-30 инъецированных зигот, причем у свиней все эмбрионы трансплантируются в один яйцевод, а у мышей и кроликов – отдельно по яйцеводам. У овец, коз и крупного рогатого скота каждому реципиенту пересаживают два-четыре эмбриона.

Синхронизация охоты достигается спариванием с вазэктомированными (стерильными) самцами, индукцией овуляции хорионическим гонадотропином человека (НСР), «мягкой» суперовуляцией или лютеолизом желтого тела.

Микроинъецированные яйцеклетки переносят реципиенту хирургической трансплантацией, так как бескровный доступ к яйцеводам даже у крупных сельскохозяйственных животных, кроме коров и кобыл, невозможен. С этой целью реципиентам под наркозом вскрывают брюшную полость, локализуют яичники и яйцеводы, контролируют реакцию яичников на индукцию овуляции (присутствие овуляционных точек, желтых тел) для исключения непригодных (несинхронизированных) реципиентов. Затем специальный катетер с находящимися в нем микроинъецированными эмбрионами вводят в яйцевод через воронку, после чего в канал яйцевода

инъектируют среду с эмбрионами.

Чтобы пересаживать проинъектированные эмбрионы крупного рогатого скота нехирургическим путем в матку реципиента, их культивируют *in vitro* до стадии морулы.

Изучение интеграции и экспрессии генов у трансгенных животных. Для доказательства интеграции используют три основных метода: блот-анализ, дот-блот-анализ и полимеразная цепная реакция. Материалом для исследований служат ядродержащие клетки тканей или внутренних жидкостей организма исследуемых животных. Отбирают пробы тканей для крови (с добавлением антикоагулирующих веществ), из кото-рых выделяют ДНК- Для блот-анализа, например, требуется 20-30 мкг ДНК. С помощью блот-анализа можно получить самое точное и надежное доказательство интеграции ДНК. Метод дот-блот-анализа используют для установления числа интегрировавшихся в геном копий. По технологии ПЦР результаты анализа могут быть получены за относительно короткое время и при наличии чрезвычайно малого количества клеточного материала.

Выделение РНК для исследования трансгенных животных на транскрипцию микроинъектированных генных конструкций проводят из тех тканей, в которых ожидается наиболее высокий уровень экспрессии.

Исследование трансляции генной конструкции проводят путем качественного и количественного анализа экзогенного протеина. Существуют различные методы доказательства присутствия тех или иных протеинов (радиоиммунологические, иммуноферментные, биологические и т. д.)

Наследование трансгенов. Для образования трансгенных линий животных решающее значение в животноводстве имеет получение таких трансгенных животных (трансгенные особи, родившиеся из инъектированных эмбрионов), все или по крайней мере часть половых клеток которых содержат трансген.

При исследовании родившихся трансгенных животных и полученного от них потомства было показано, что, несмотря на инъекцию ДНК на ранних стадиях (в пронуклеус оплодотворенных яйцеклеток), могут появляться мозаики. Мозаиками считаются животные, состоящие из двух или нескольких клеточных линий, происходящих из одной зиготы, но имеющих различные генотипы. Трансгенные мозаики кроме клеточных линий, содержащих трансген, имеют нетрансгенные клеточные линии. При получении от таких животных трансгенного потомства и при выделении трансгенных линий могут возникнуть трудности. Так, если клетки гонад не содержат трансген, потомство не может наследовать инъектированный ген от трансгенной родительской формы.

На основании существующих данных можно сделать вывод, что около 30% первичных трансгенных животных, полученных методом микроинъекции, являются мозаиками. Поэтому трансген не передается потомству с ожидаемой, согласно законам Менделя, частотой 50%. Часть мозаиков вообще не может дать начало трансгенным линиям, так как у них

отсутствует передача трансгена по наследству.

В норме наследование трансгена соответствует законам Менделя для моногибридного скрещивания, так как в большинстве случаев интеграция происходит только в одной-единственной точке одной хромосомы. По этой причине таких трансген-ных животных определяют как гемизиготных. Термин «гетерозигота» здесь неприменим, потому что на гомологичной нетрансгенной хромосоме отсутствует соответствующий трансгену аллель.

Экобиотехнология решает проблемы по охране окружающей среды, такие как переработка отходов, очистка воды, устранение загрязнений.

В процессе круговорота загрязняющих веществ в экосистемах огромную роль играют микроорганизмы.

Многие из созданных человеком низкомолекулярных соединений (ядохимикаты, детергенты) и высокомолекулярных полимеров устойчивы и не разлагаются микроорганизмами, кроме того, они проявляют мутагенное, канцерогенное, тератогенное влияние, поэтому для их утилизации требуется разработка более совершенных технологий очистки. В воде и почве биотрансформация ксенобиотиков протекает под воздействием энзимов и микроорганизмов.

Изучение реакций в почвах затруднено гетерогенностью среды и адсорбцией ксенобиотиков, микроорганизмов и энзимов на частицах и коллоидах почв.

Многие ксенобиотики в биосфере достаточно устойчивы, например, ДДТ не исчезает из почвы 30 лет, альдрин и хлордан – 15 лет, диэльдрин – 25 лет, гептахлор – 14 лет.

Некоторые вещества при распаде образуют еще более устойчивые и токсичные соединения.

Одним из направлений экобиотехнологии является **получение экологически чистой энергии**. Экологически чистой считается энергия, получаемая путем преобразования солнечной энергии в электрическую с помощью солнечных коллекторов, а также энергия биогаза и микробного этанола.

Биогаз – это смесь, состоящая из 65% метана, 30% CO₂, 1% H₂S и незначительных примесей азота, кислорода, водорода и угарного газа.

Энергия, заключенная в 1 м³ биогаза, эквивалентна энергии 0,6 м³ природного газа или 0,74 л нефти, или 0,66 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 в анаэробных условиях до метана и диоксида углерода.

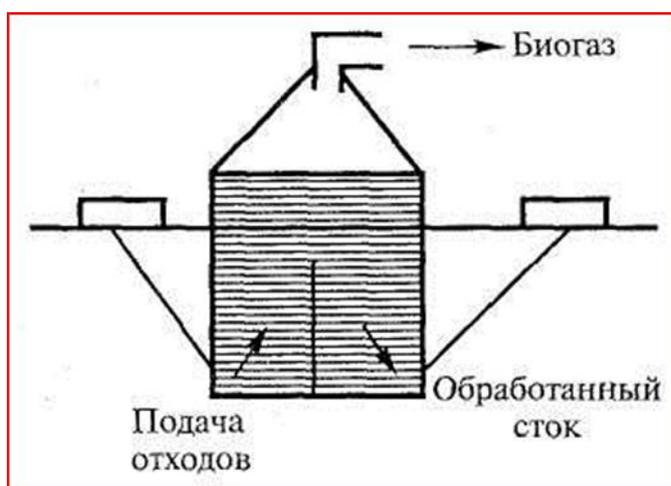
Микробиологическому разложению поддаются практически все соединения природного происхождения, а также значительная часть ксенобиотиков органической природы.

Для получения биогаза можно использовать отходы животноводства,

сельского хозяйства, испорченные продукты, стоки крахмалоперерабатывающих предприятий, жидкие отходы сахарных заводов, бытовые отходы, сточные воды городов.

Процесс ведут при 30–60 °С и рН 6–8. Получение биогаза широко применяют в Индии, Китае, Японии. Чаще всего используют вторичные отходы (отходы животноводства и сточные воды городов).

Схема устройства реактора для обработки сельскохозяйственных отходов



Подача навоза, остатков растениеводства осуществляют в нижней части реактора. Режим его работы может быть периодический или полунепрерывный. Реактор обычно имеет две (или более) секции для разделения стадий процесса. Биогаз сгорает с образованием CO_2 и H_2O , а в реакторе остается естественное удобрение – сапропель, содержащий азот, фосфор, соли калия, необходимые для роста растений. Использование сапропеля целесообразнее навоза, т.к. навоз перегружает почву.

В анаэробном процессе биометаногенеза выделяют три последовательные стадии, в которых участвуют свыше 190 различных микроорганизмов.

На первой стадии энзиматическому гидролизу подвергаются белки, липиды, полисахариды.

На второй стадии идет образование ацетата, которое может протекать двумя путями:

- ацетогенные микроорганизмы усваивают H_2 , CO_2 и некоторые одноуглеродные соединения с образованием ацетата;
- гомоацетатные микроорганизмы усваивают H_2 , CO_2 и некоторые одноуглеродные соединения с образованием ацетата.

На третьей стадии образуется метан. Он может синтезироваться через

стадию восстановления углекислого газа с молекулярным водородом, а также из метильной группы ацетата. Некоторые метановые бактерии в качестве субстрата используют формиат, углекислый газ, метанол, метиламин и ароматические соединения.

В зависимости от температуры протекания процесса метановые бактерии разделяют на *мезо- и термофильные*. Оптимальная температура для мезофильных бактерий – 30–40 °С, для термофильных – 50–60 °С.

В целом, термофильный метаногенез идет интенсивнее мезофильного, причем субстрат обеззараживается от патогенной микрофлоры и гельминтов.

Микрофлора метаногенеза формируется в основном микрофлорой желудочно-кишечного тракта животных:

Lactobacillus acidophilus,

Eubacterium aerofaciens,

Methanobacterium mobile,

Methanosarcina sp.,

Methanobrevibacterium ruminantium.

Метанобразующие бактерии 90 – 95% углерода превращают в метан и лишь 5–10% углерода – в биомассу.

Анаэробная биоконверсия органических отходов в метан – наиболее конкурентоспособная область биоэнергетики, позволяющая получать из местного сырья биогаз как локальный источник энергии. Основное преимущество биогаза – он возобновляемый источник энергии. В природе в результате деятельности бактерий образуется ежегодно около 800 млн. тонн метана, примерно столько же добывается людьми.

Современные источники энергии – ГЭС, ТЭС, АЭС – вызывают серьезные нарушения во внешней среде. ГЭС – причина затопления территорий, изменения ландшафта, гибели биоценозов. ТЭС загрязняют атмосферу, вызывают отчуждение земель. АЭС создают угрозу радиационного загрязнения. Сжигание нефти и газа повышает концентрацию CO₂, образование смога и, кроме того, уменьшение ресурсов нефти и газа.

С 1975 г. производство пищевого этанола остается постоянным, а производство топливного этанола возросло в 10 раз. Этанол может применяться как топливо самостоятельно или в смеси с бензином в количестве 10–26%, такую смесь в США называют газохол; или в смеси с дизельным топливом – 3%. Эти смеси могут быть использованы без изменений в конструкции двигателей внутреннего сгорания.

В мировом производстве первое место занимает производство спирта из сахарного тростника (Бразилия, США). При переработке сахарного тростника его тщательно давят, сок концентрируют и подвергают брожению. На втором месте находится маниок (кассава) – крахмалистое растение, способное расти на скудных почвах.

Считают, что бразильский вариант биотехнологического решения топливной проблемы – наилучший, однако лучшие пахотные земли засеивались сахарным тростником, при этом для одного автомобиля требуется ~ 13000 м², а для одного человека 800 м² – один автомобиль отбирает пищу у

18 жителей. В то же время в Бразилии миллионы людей страдают от недоедания. Стоки же со спиртовых заводов загрязняют водоемы и нарушают экологию.

Производство спирта из сахарного тростника экономически неоправдано (Бразилия), из кукурузы (США) – субсидируется государством, чтобы цена на этанол была ниже, чем на нефтепродукты. В других регионах себестоимость биоэтанола еще выше, поскольку выше себестоимость сырья. Снижение себестоимости этанола может быть достигнуто заменой сырья или кардинальным изменением технологии ферментации.

Лигноцеллюлоза (древесина) состоит из трех полимеров: целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина. Путем химического или энзиматического гидролиза эти полимеры расщепляются до мономеров с последующей ферментацией сахаров до этанола. Несмотря на неполный гидролиз (из-за сложности химического строения молекул полимеров) процесс экономически выгоден.

Кроме того, найдены виды дрожжей, способные сбраживать в спирт не только гексозу (глюкозу), но и ксилозу; использование таких дрожжей приводит к более полному использованию сахаров, повышается выход спирта, и снижается его себестоимость. Из гидролизатов древесины и сульфитных щелоков (отход в целлюлозно-бумажном производстве) в России получают технические спирты.

Бытовые и промышленные сточные воды – сложная смесь, содержащая различные питательные вещества и самые разнообразные микроорганизмы, поэтому для обработки стоков необходимо такое большое количество различных протистов. Эти организмы конкурируют в потреблении питательных веществ, уничтожают друг друга и взаимодействуют многими другими путями, характерными для небольшой экологической системы.

В сточных водах содержится сложная смесь твердых и растворенных веществ, причем последние обычно присутствуют в очень малых концентрациях. На очистных станциях концентрации всех этих веществ снижают до приемлемого уровня или же химически трансформируют вредные вещества в безопасные соединения.

В процессе первичной обработки отделяют влажные концентрированные твердые вещества, называемые илом;

при вторичной обработке образуется активный клеточный ил.

Процессы вторичной биологической обработки с участием множества видов микроорганизмов очень эффективны при деградации разбавленных смесей органических отходов, но при этом образуется и биомасса.

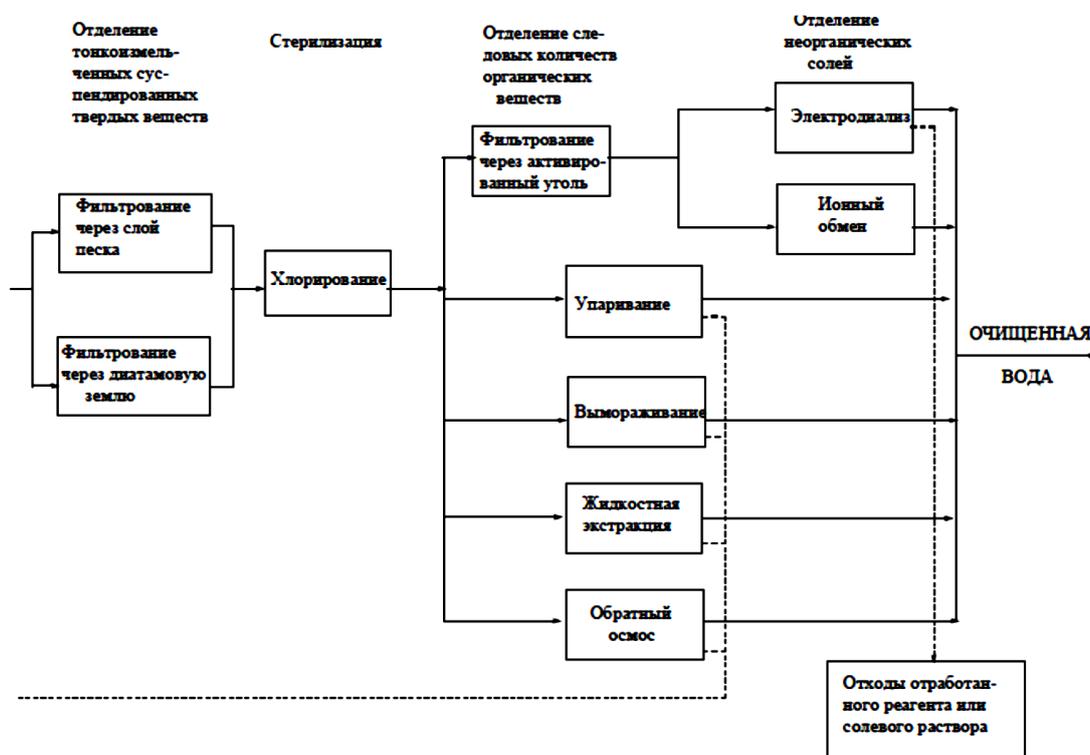
Цель третичной обработки заключается в полном или частичном отделении всех оставшихся примесей.

На этой стадии используются такие методы, как электродиализ, обратный осмос, фильтрование через толстый слой и адсорбция.

Таким путем очень мелкие нерастворимые частицы и растворенные компоненты жидких отходов частично превращаются в ил, который легче поддается отделению, чем исходные загрязняющие вещества. Установки для

переработки ила являются важной составной частью станций по очистке сточных вод.

Для уменьшения объема ила, образующегося при очистке воды, широко применяется операция анаэробной переработки, при которой органические вещества подвергаются биологической деградации в анаэробной среде.



Бытовые сточные воды обычно содержат более 99% воды, около 300 млн–1(мг/л) суспензированных твердых веществ, около 500 мг/л летучих веществ. Большая часть твердых веществ – целлюлозной природы, а другие загрязняющие органические вещества включают (в порядке убывания концентрации) жирные кислоты, углеводы и белки. Неприятный запах бытовых сточных вод обусловлен разложением белков в анаэробных условиях.

В них содержатся почвенные и кишечные микроорганизмы, в т.ч. аэробные организмы, облигатные и факультатив-ные анаэробы, дрожжи, плесени и грибы. В бытовых сточных водах часто присутствуют патогенные организмы и вирусы. Чрезвычайно важна полная изоляция источников и трубопроводов для подачи питьевой воды от загрязнения сточными водами. Такие популяции микроорганизмов – постоянный смешанный посевной материал для процессов биологической очистки и источник метаболической активности в стандартных методах определения степени загрязнения сточных вод.

В стоках промышленных предприятий, связанных с переработкой материалов углеводородной природы, часто содержатся и ядовитые вещества: формальдегид, аммиак или цианиды и др.

Возникают две проблемы:

- эти стоки чрезвычайно опасны для живых организмов в водоемах, куда они сбрасываются;

- они могут убивать микроорганизмы, участвующие в аэробных и анаэробных процессах переработки отходов.

Эффективные и экономичные методы обезвреживания токсичных веществ пока не разработаны.

В процессах с участием активного ила основной тип оборудования – **проточный аэрируемый биологический реактор (аэротенк)** связанный с отстойником, в котором вода осветляется. Часть ила, собирающегося в отстойнике, вновь поступает в биореактор для постоянной инокуляция илом. Рециркуляция увеличивает среднее время пребывания ила в системе, позволяя микроорганизмам адаптироваться к имеющимся питательным веществам. Ил должен оставаться в аэробном биореакторе долго, чтобы окислились все адсорбированные органические вещества.

Одним из наиболее типичных для активного ила организмов является бактерия *Zoogloea ramigera*. Возможно, наиболее важной характеристикой ее и многих других видов в активном иле, является способность синтезировать и секретируют полисахаридный гель. Он и вызывает агрегацию микроорганизмов и образование хлопьевидных скоплений (флокул), называемых активным илом, с высоким сродством к суспендированным твердым веществам, в т.ч. коллоидальным частицам.

Это – причина того, что первой стадией разрушения суспендированных твердых частиц в сточных водах является их присоединение к флокулам. Затем, способные к биодegradации компоненты адсорбированных частиц претерпевают окисление организмами флоккулы.

Чтобы выгоднее использовать высокую адсорбционную способность активного ила, разработан вариант обычного процесса контактной стабилизации. Рециркулирующий осажденный ил повторно аэрируют до контакта с отходами, поступающими в аэрируемый резервуар. В нем органические вещества связываются с флокулами. Биологическая утилизация их происходит, в основном, повторной аэрацией рециркулирующего ила; восстанавливается и адсорбционная способность флокул ила.

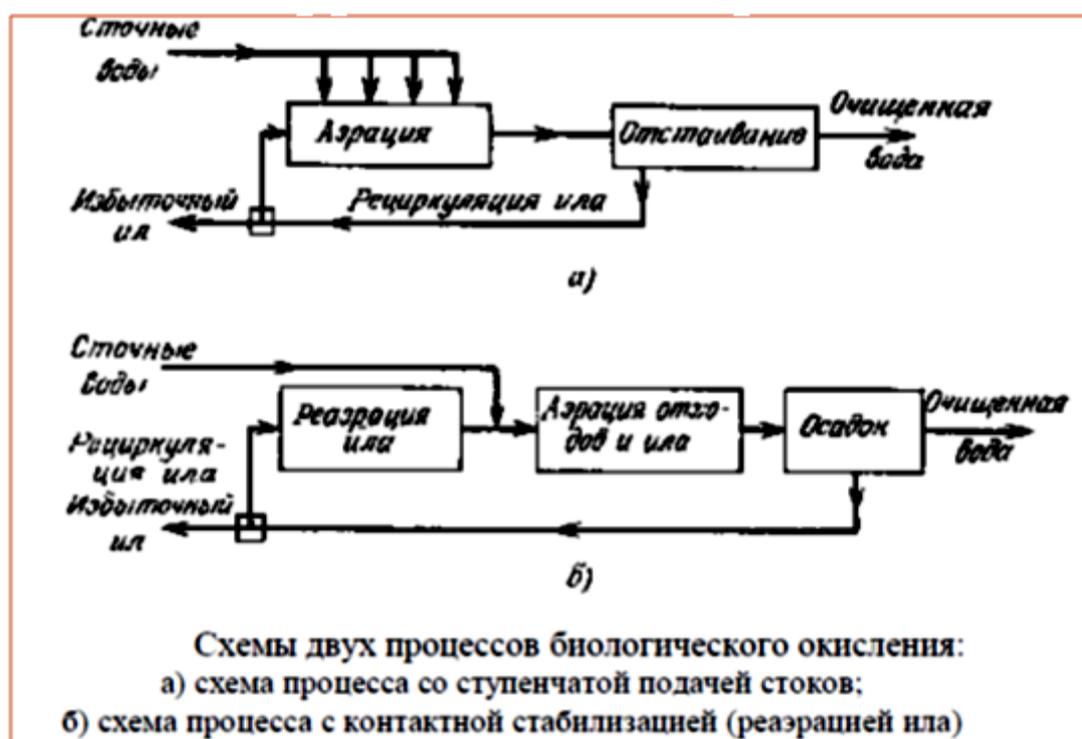
Обычный аэротенк с активным илом – узкий длинный канал (коридор), приближающийся к трубчатому реактору с незначительной дисперсией. Распределение поступающего потока по длине реактора изменяет характеристики системы так, что он по своему поведению приближается к емкостному реактору с полным перемешиванием.

Еще ближе к реактору с полным перемешиванием бассейн круглой формы, содержимое которого интенсивно аэрируется для обеспечения массопереноса и перемешивания. Здесь градиенты концентраций растворенного кислорода и питательных веществ минимальны, а развивающаяся популяция организмов активного ила лучше переносит флуктуации нагрузки или резкие повышения концентраций токсичных

веществ.

Помимо барботаж с перемешиванием, обычно используемого в микробиологических процессах, здесь возможно барботирование воздуха через диффузоры, расположенные на дне или в стенках резервуара. В другом варианте на поверхности бассейна вращается мешалка с лопастями, создающая турбулентные течения и способствующая поглощению газа. Третий вариант предусматривает перемешивание и аэрацию с помощью конуса, забирающего жидкость со дна бассейна и разбрызгивающего ее на стенки резервуара.

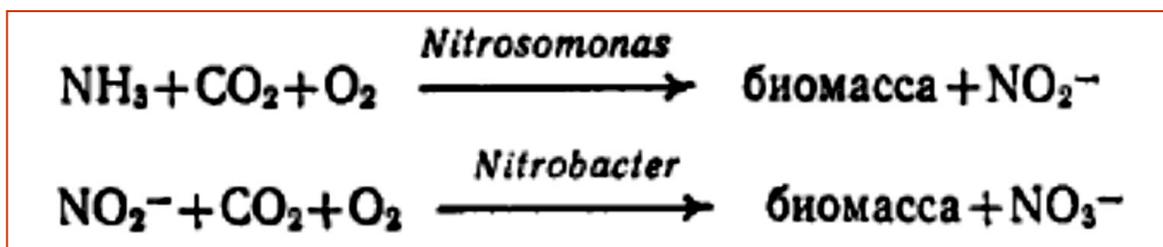
Во всех случаях основной задачей системы аэрации и перемешивания является снабжение кислородом микроорганизмов, суспендирование и перемешивание ила и других нерастворимых компонентов системы, а также удаление летучих продуктов метаболизма организмов ила, например CO_2 .



Активный ил с большим содержанием биопродуктов часто подвергают еще одной операции аэробной обработке; в отсутствие поступления свежих сточных вод. В таких условиях биомасса в результате эндогенного дыхания утилизирует свои же источники углерода и содержание твердых компонентов уменьшается обычно на 50%. Рециркуляцию биомассы не применяют, пребывание последней в реакторе составляет 15-25 суток. *Основная цель* – уменьшение общей массы ила, подлежащего перевозке транспортом и уничтожению.

В обычных процессах обработки отходов с аэрацией в числе подвергающихся биологическому окислению субстратов имеются и азотсодержащие органические вещества. Из них при биологическом окислении обычно сначала образуется аммиак, который затем необходимо

окислить до нитрита и, наконец, до нитрата; только в этом случае очищенная вода будет обладать достаточно низкой величиной БПК.



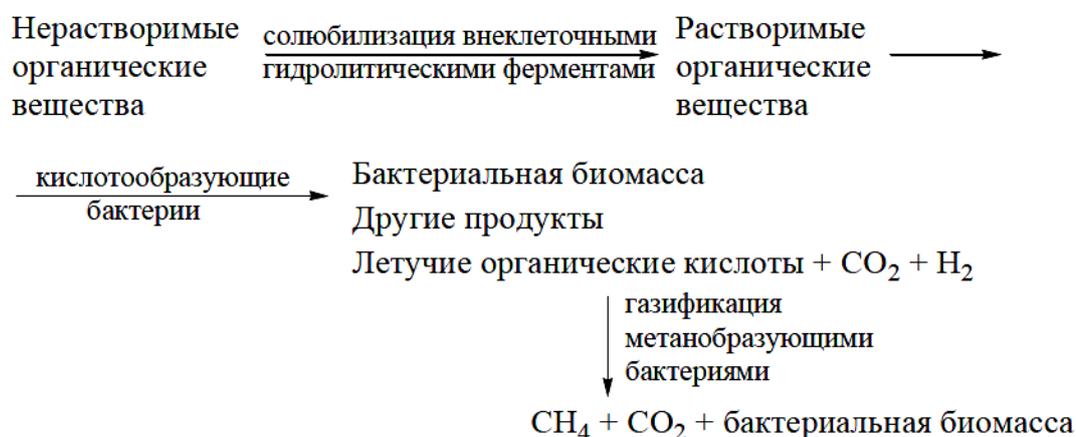
В распространенном варианте очистки сточных вод с участием активного ила применяют так называемые капельные, или перколяционные, биологические фильтры. В биологическом фильтре популяции микроорганизмов существуют в виде пленки или слизистого слоя на поверхности твердой насадки, неплотно заполняющей резервуар (доля пустот составляет около 0,5); в таких условиях воздух легко поступает в нижние слои насадки.

Разделение организмов в пространстве биологического фильтра позволяет каждому виду полностью адаптироваться к соответствующему окружению. По этой причине, в частности, низко нагружаемые биологические фильтры обычно обеспечивают большую прозрачность и большую степень нитрификации очищенной воды, чем системы с активным илом.

Основой другого метода очистки сточных вод являются так называемые биологические пруды; этот метод очистки намного проще, чем водоочистка с помощью активного ила или биологических фильтров. В биологических окислительных прудах, напоминающих естественные водные экосистемы, в процессе фотосинтеза водоросли выделяют кислород; поддерживается аэробный режим для бактерий, утилизирующих органические загрязняющие вещества.

Отходы, содержащие значительные количества ферментируемых органических соединений, можно подвергать биологической обработке в анаэробных условиях. Хотя анаэробная обработка применяется во многих процессах, основной сферой использования этого метода является переработка избыточного активного ила.

Механизм анаэробной переработки отходов, в котором участвует множество видов микроорганизмов, в самом общем и упрощенном виде можно описать следующей схемой



На первой стадии твердые частицы или солубилизируются или диспергируются внеклеточными ферментами самых различных бактерий. В системах для анаэробной обработки или обнаружены протеолитические, липолитические и целлюлолитические ферменты. В биореакторах для анаэробной переработки или твердые вещества не накапливаются, реакции солубилизации идут достаточно быстро и эта стадия не лимитирует скорость всей последовательности превращений.

Следующая стадия – микробиологического синтеза низкомолекулярных жирных и летучих кислот из растворенных органических веществ. Скорость реакций также довольно высока. Ответственны за эти превращения кислотообразующие бактерии (факультативные анаэробы гетеротрофы и лучше всего функционируют при pH 4,0-6,5). Главный продукт – ацетат, в некоторых количествах – пропионовая и масляная кислоты.

Важнейшим субстратом для *последней стадии* процесса является уксусная кислота; около 70% всего метана образуется именно из этого субстрата. Стадия газификации осуществляется с участием метанобразующих бактерий, являющихся облигатными анаэробами.

Они наиболее активны в гораздо более узком диапазоне pH (7,0-7,8); их сложно выделить в виде чистых культур, но в адекватно эксплуатируемом биореакторе (метантенке) смешанная культура этих бактерий находит очень хорошие условия для жизнедеятельности. Превращение летучих кислот в CH₄ и CO₂ лимитирует скорость всей последовательности превращений.

14. ВОЗМОЖНЫЕ РИСКИ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

Трансгенные, или генетически модифицированные, организмы (ГМО) – это организмы, постоянный генетический материал которых был изменен методами генной инженерии.

Считается, в частности, что в биотехнологии найдут применение трансгенные растительные организмы, разнообразные по своему составу, включающие сочетание представителей разных царств – животного, растительного и мира микроорганизмов.

Задача генной инженерии – активная и целенаправленная перестройка генов живых существ и их конструирование, т.е. управление наследственностью.

В генетической инженерии человека, как и в генетическом конструировании растений, пока не достигнуто тканеспецифического выражения генов. Решения данной проблемы ищут на путях введения определенных промоторов регуляторных участков в конструируемые векторы. Пока остается достаточно отдаленной задачей возможность улучшения пород сельскохозяйственных животных.

К настоящему времени практически нет сведений по генетике таких признаков, как плодовитость, выход и жирность молока, повышение устойчивости к болезням и др.

Получение ГМО включает в себя несколько основных этапов:

- **Выделение и идентификация отдельных генов** (соответствующих фрагментов ДНК или РНК), которые собираются перенести другим организмам. Для этого из организмов, обладающих такими генами, выделяют нуклеиновые кислоты. Их разрезают на отдельные фрагменты, используя рестриктазы. Наиболее значимы рестриктазы, способные разрезать нуклеиновые кислоты с образованием, т.н. липких (комплементарных) концов. Образующиеся фрагменты имеют короткие однонитчатые концы, состоящие из нескольких нуклеотидов. Если объединить фрагменты ДНК разного происхождения, полученные с помощью одной и той же рестриктазы, дающей липкие концы, и добавить лигазу, то эти фрагменты соединятся между собой. В результате получится химерная (рекомбинантная) ДНК, содержащая фрагменты ДНК, выделенные из различных организмов или синтезированные искусственно. Эта технология позволяет создавать на основе плазмид (или других типов векторов) сложные генетические конструкции для переноса в клетки других организмов.

- **Клонирование** (размножение) переносимого гена. Чтобы размножить созданные немногочисленные химерные молекулы ДНК, векторы со встроенными в них фрагментами необходимо перенести в реципиентные клетки. Плазмидные векторы обычно вводятся в реципиентные клетки методом генетической трансформации.

Трансформация – процесс изменения генетических свойств клетки в результате проникновения в нее чужеродной ДНК. Впервые она была

обнаружена у пневмококков Ф. Гриффитом. Он показал, что клетки невирулентных штаммов бактерий при заражении ими мышей совместно с вирулентными приобретают патогенные свойства. Затем трансформация была продемонстрирована и изучена у различных видов бактерий. Особенно широкое распространение для клонирования векторных ДНК получила трансформация клеток *E. coli*, основанная на совместной инкубации «компетентных» клеток бактерий (клетки способные к трансформации) и ДНК. В результате трансформации ДНК «поглощается» бактериальными клетками и автономно размножается в их цитоплазме (внутренняя среда клетки). К трансформации способны лишь некоторые, т.н. компетентные, клетки (способные включать чужеродную ДНК и синтезирующие особый трансформирующий белок). Компетентность клетки определяется также факторами внешней среды. Этому может способствовать обработка клеток полиэтил-ленгликолем или CaCl_2 .

На селективной среде ведут отбор трансформированных бактериальных клеток, несущих какой-либо селективный маркер, который уже был на векторе или должен был появиться в процессе образования рекомбинантной молекулы. Если, например, вектор содержал ген устойчивости к антибиотику ампицилину, то в селективную среду, добавляя этот антибиотик, и все выжившие клетки будут содержать данный вектор. Чтобы выяснить, несут ли трансформированные клетки рекомбинантную ДНК, из клеток выделяют векторную плазмиду и подвергают электрофорезу.

• **Перенос гена** (или трансгенной конструкции) внутрь клетки и встраивание его в ДНК реципиентного организма. Основным способом переноса – трансформация. Она включает в себя несколько основных этапов и требует соблюдения ряда условий: наличия трансформирующей ДНК; «компетентных» клеток; интеграции донорской (трансформирующей) ДНК в ДНК реципиента и экспрессии перенесенных генов.

Существуют различные методы трансформации:

- путем гибридизации соматических клеток;
- инкубации реципиентных клеток с чужеродным генетическим материалом;
- микроинъекцией генетического материала в ядра клеток животных и др.

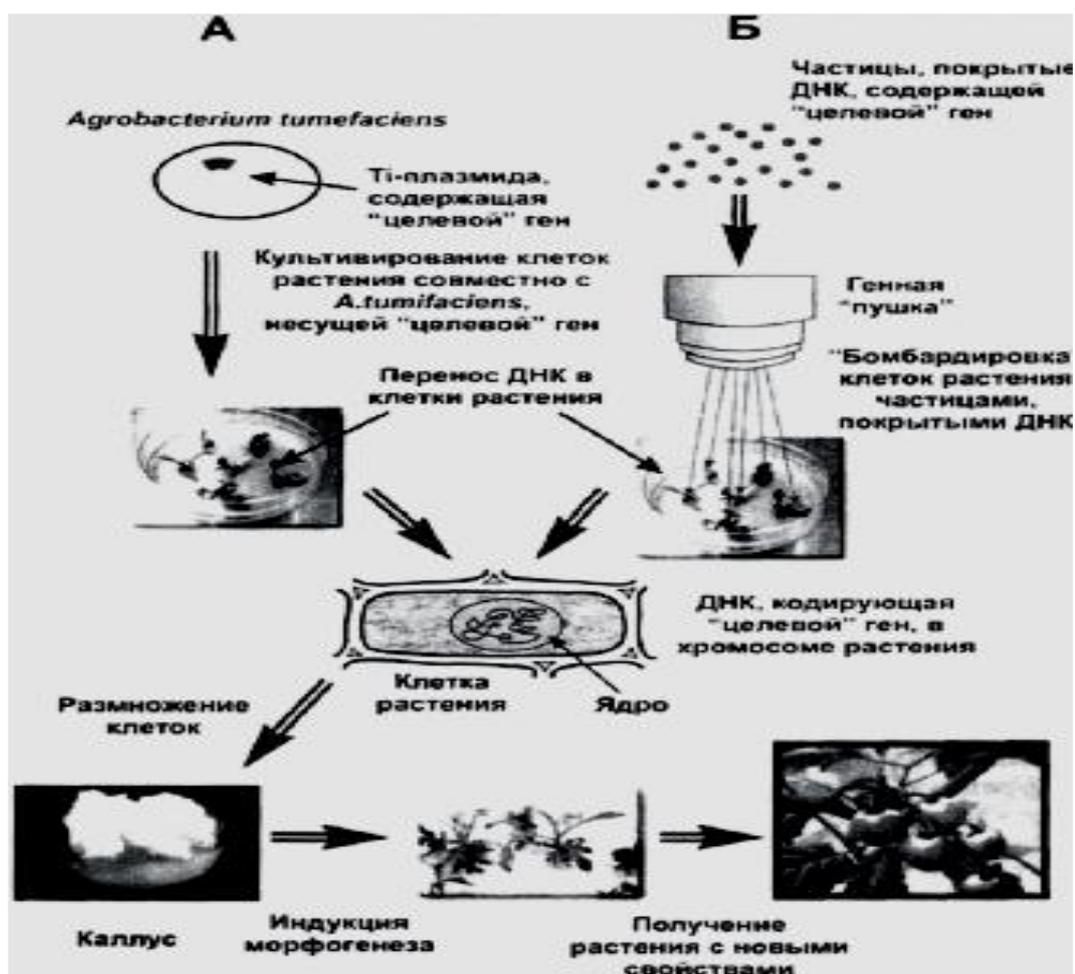
Их применение, прежде всего, зависит от биологических особенностей реципиента.

Для трансформации клеток растений используют два основных метода

- *Метод биологической баллистики.* На мельчайшие частицы вольфрама или золота напыляют ДНК, содержащую «целевой» ген. Эти частички с ДНК помещают в генную «пушку». После «выстрела» они с огромной скоростью «бомбардируют» клетки растений, проникая в цитоплазму и ядра. Некоторые клетки встраивают «целевой» ген в свою ДНК, и из каждой клетки может быть регенерировано новое трансгенное

растение.

- *Трансформация растения с помощью Ti-плазмиды*, несущей «целевой» ген, доставляемый в клетки с помощью почвенной бактерии (*Agrobacterium tumefaciens*). **Ti-плазмида** – это кольцевая молекула ДНК содержащаяся в клетках *A. tumefaciens*, вызывающей образование опухолей у растений при их заражении этой бактерией. При заражении бактериями растений, небольшой фрагмент Ti-плазмиды встраивается в геном растительных клеток, вызывает нарушение гормонального баланса и переход к неконтролируемому делению и росту, что и приводит к образованию опухоли.



«Целевой» ген, способный изменять свойство растения, встраивается генно-инженерными методами в Ti-плазмиду, которая, переносится в агробактерию. При совместном культивировании агробактерии и культуры клеток растения-хозяина Ti-плазмида попадает в клетки растений, а «целевой» ген с дополнительными фрагментами ДНК встраивается в растительный геном. Каждая такая клетка может быть затем регенерирована в целое трансгенное растение, содержащее генетическую информацию из двух или нескольких различных организмов. Этот метод применяется для трансформации двудольных растений.

Другие способы. Можно энзимами растворить толстую клеточную

оболочку растительной клетки, мешающую прямому проникновению чужой ДНК, и поместить такие очищенные клетки в раствор, содержащий ДНК химическое вещество, способствующее ее проникновению в клетку (чаще всего полиэтилен-гликоль). Иногда в мембране клеток проделывают микроотверстия короткими импульсами высокого напряжения, а через отверстия в клетку могут пройти отрезки ДНК. Иногда применяют даже впрыскивание ДНК в клетку микрошприцем под контролем микроскопа.

• **Выявление трансгенных клеток (организмов).** Процесс переноса и включения в генетический материал клеток растений чужеродной ДНК происходит с достаточно небольшой частотой, в лучшем случае трансформированной оказывается 1 клетка на 10^3 . Поэтому необходимо отделить такие клетки от остальных и создать для их деления и развития наиболее благоприятные условия.

В этом случае вместе с «целевым» геном вводят и второй, так называемый **селективный ген**. Чаще всего для этого используют гены устойчивости к антибиотикам. Если после введения чужеродной ДНК поместить клетки на питательную среду с антибиотиком, то на ней способны будут расти только трансформированные клетки.

Увеличение использования ГМО и их компонентов в производстве продуктов питания, кормов и фармацевтических препаратов делает все более актуальным вопрос разработки эффективных методов идентификации трансгенной ДНК. В настоящее время наиболее разработаны и широко применяются методы, основанные на использовании различных видов ПЦР (полимеразная цепная реакция).

ПЦР позволяет проверить генетический материал, выделенный из исследуемого образца, на наличие в его составе участка чужеродной или измененной ДНК и используется для получения множества копий не-протяженных участков ДНК, специфичных для каждого конкретного белка, а также исследуемого генетически обусловленного признака.

В основе ПЦР лежит способность ДНК-полимераз, осуществлять направленный синтез второй, т.е. комплементарной (спаренной) цепи ДНК, по имеющейся матрице одноцепочечной ДНК, наращивая небольшую олигонуклеотидную затравку (праймер), комплементарную участку этой матрицы, до размеров в несколько тысяч (десятков тысяч) звеньев.

Кроме ПЦР для выявления трансгенных фрагментов ДНК используют ряд других методов:

- Исследование трансгенных белков.
- Хроматографические методы, если генетическая модификация ведет к появлению и/или увеличению содержания специфических жирных кислот или триглицеридов.
- Методы спектроскопии, если изменяется структура растительных волокон при отсутствии видимых изменений состава белков или жирных кислот.
- Технология ДНК-чипов. **ДНК- чипы** – наборы из большого числа

олигонуклеотидов на миниатюрных твердых подложках для анализа последовательности ДНК. Метод основан на том, что с помощью фотолитографии на небольшой поверхности размещают огромное число олигонуклеотидов (одноцепочечные фрагменты ДНК).

После проведения ПЦР, полученные продукты реакции могут быть автоматически проанализированы методом гибридизации с мечеными олигонуклеотидами на ДНК-чипах, что значительно ускоряет процесс идентификации трансгенной ДНК.

На Российском рынке ГМ-продукция появилась в 90-е годы. На 01.01.08 г. в РФ прошли полный цикл всех необходимых исследований и разрешены для использования в пищевой промышленности и реализации населению 16 видов прод. сырья (7 линий кукурузы, 3 линии сои, 4 линии картофеля, линия ри-са и сахарной свеклы) из ГМ-источников, 5 видов ГМ-микроорганизмов.

Разрешенных сортов немного, но добавляются они во многие продукты (хлебобулочные изделия, мясные и молочные продукты). Много их и в детском питании, особенно для самых маленьких. Наиболее распространенной добавкой является ГМ-соя, устойчивая к гербициду раундапу (линия 40.3.2).

Комиссия Государственной экологической экспертизы (РАН, РАМН, РАСХН) по оценке безопасности ГМ-культур, работающая в рамках закона РФ «Об экологической экспертизе», не признала ни одну из представленных для утверждения линий безопасной.

В России выращивание ГМ-культур официально запрещено, а вот импорт ГМ-продуктов почему-то разрешен. В РФ много продуктов, содержащих ГМ-компоненты, но все они без соответствующих маркировок, несмотря на подписанное В.В.Путиным в 2005г. «Дополнение ...» к закону о защите прав потребителей об обязательной маркировке ГМ-компонентов.

Проверка Институтом питания РАМН не соответствовала Методическим Указаниям по проверке ГМО, подписанным Главным Государственным санитарным врачом РФ, а в некоторых случаях полученные данные полностью расходились с выводами!!!

Так, при экспериментальной проверке на крысах сортов американского ГМ-картофеля Институтом питания у животных наблюдались серьезные морфологические изменения в печени, почках, толстой кишке; понижение гемоглобина; усиление диуреза; изменение массы сердца и предстательной железы.

В научной литературе появились статьи о взаимосвязи ГМО с онкологией.

Возможно, рост в последнее время в России онкологических заболеваний желудочно-кишечного тракта, особенно прямой кишки (Медицинское информационное агентство, 2003), связано с использованием ГМ-продуктов.

Действие ГМ-продуктов на человека совершенно не изучено,

последствия непредсказуемы.

В РФ практически не проводятся научные и клинические исследования влияния ГМО на животных и человека. Попытки провести такие исследования наталкиваются на огромное сопротивление.

Проведенная элементарная проверка влияния ГМ-сои, устойчивой к гербициду раундапу (линия 40.3.2), на потомство лабораторных крыс показала повышенную смертность крысят первого поколения, недоразвитость выживших крысят, патологические изменения в органах и отсутствие второго поколения!!

Ряд городов России объявил себя зонами, свободных от ГМО. В стране введена обязательная маркировка продуктов, содержащих более 0,9% ГМО от ингредиента. В Москве и других городах России организованы лаборатории для населения страны по проверке семян и продуктов питания на наличие ГМ-компонентов.

Официально «Зона, свободная от ГМО» впервые прозвучала в заявлении британского отделения Партии природного закона 28.09.1998, призвавшей власти графств Вели-кобритании к созданию ЗСГМО. Это включало в себя запрет на выращивание ГМ-культур на всех землях совета графства, запрет на использование ГМингредиентов в продуктах питания во всех государственных учреждениях, в т.ч. школах, медицинских учреждениях, домах престарелых.

Термин «свободен от ГМО» может оказаться не совсем корректным, так как создание ЗСГМО не гарантирует полного отсутствия трансгенов на данной территории. Закон распространяется только на государственные земли, а фермеры при желании могут выращивать ГМ-культуры.

Основные европейские аргументы в пользу создания ЗСГМО описаны в докладе «Сейчас или никогда» международной организации «Друзья земли».

В ней подчеркивается, что, приняв решение об отказе от ГМО:

- местные власти получают возможность избежать практических трудностей, связанных с совместным выращиванием ГМО и традиционных культур, а также избежать возможных затрат;

- участники продовольственного рынка от фермеров до производителей продуктов питания и дистрибьютеров смогут сохранить свою репутацию и повысить качество продукции;

- общество получит уверенность, что власти заботятся об окружающей среде и его благополучии, и реальную возможность покупать продукты не содержащие ГМО.

На данном этапе создания ЗСГМО дает возможность фермерам, не желающим выращивать ГМ-культуры, гарантировать, что их продукция не содержит случайных трансгенов с соседних полей. Такие фермеры могут рассчитывать на долгосрочную поддержку местных властей, которые все больше стремятся к независимости от транснациональной экономики.

Одним из последних примеров в этом смысле является итальянская провинция Лацио. В октябре 2006 года там принят закон, согласно которому

местным компаниям, выращивающим ГМ-культуры, будет отказано в предоставлении финансовой поддержки на региональном уровне, а компании будут обязаны вернуть все полученные ранее от региона деньги.

Юридической основой для создания ЗСГМО в Европе является декларация фермеров, местных властей или другого собственника земельных участков, а также организаций или сообществ.

Человек впервые получил полную власть над природой – создание абсолютно новых живых существ. Возможности открылись просто фантастические: лечение болезней, избавление мира от угрозы голода, выращивание культурных растений в сложных условиях и даже клонирование.

В генный ряд картофеля «добавили» ген скорпиона, после его перестал есть колорадский жук, в томаты и клубнику внедрили ген полярной камбалы – эти культуры перестали бояться морозов.

После изменения генов кукурузы, пшеницы, сои, хлопка и риса они стали устойчивыми к сорнякам, а, значит, перестали нуждаться в различных гербицидах, фунгицидах и себестоимость продукции из таких растений упала в разы. Перспектива – полное избавление землян от голода, а сегодня, по подсчетам ООН, 950 миллионов людей во всем мире недоедают.

Несколько ведущих американских ученых, первым из которых поставил свою подпись Пол Берг, опубликовали в журнале «Сайнс» письмо, в котором призвали остановить работы по генной инженерии, до тех пор, пока не будут выработаны правила техники безопасности обращения с трансгенными организмами, которые, как полагалось, могут, помимо воли исследователей, иметь свойства, опасные для человека и среды его обитания.

Есть и экономическая проблема, связанная с ГМ-культурами, а именно монополизация рынка. Международные компании, в которых в настоящее время сосредоточена основная часть работ по генетической инженерии, стремятся к монопольному контролю за рынком генетически модифицированных сортов, а следовательно, и за рынком продовольствия.

Фирма «Monsanto» владеет 94% всех трансгенных растений, выращиваемых в мире. Монополизация в области биологического бизнеса, в т.ч. собственности на трансгенные сорта (эксклюзивные права на сою как культуру, семена и разновидности этого растения; создание частных банков генов и т.д.), при котором получение прибыли является самодовлеющим фактором, может иметь крайне отрицательные последствия для всего мирового сообщества.

Можно выделить следующие риски производства генетически модифицированных продуктов.

- *Опасность объединения видового состава и сортамента сельскохозяйственных культур.* Одним из последствий широкого распространения ГМ-культур может стать сокращение генетического разнообразия дикорастущих, но и культурных растений на Земле;

- *Термальные технологии.* При посеве семян с признаками «термальности» удастся получить лишь одно поколение растений, дающих

полноценный товарный урожай; семена (плоды) последних оказываются либо невсхожими, либо погибают сразу после всходов.

- *Вертикальный перенос генов* реализуется при перекрестном опылении и половой гибридизации трансгенных растений и их сородичей. Реальная возможность этого переноса генов к дикорастущим сороди-чам будет увеличивать селективные преимущества сорных растений.

- *Горизонтальный перенос трансгенов*. Опасность спонтанного распространения селективных и маркерных генов (трансгенные растения – вектор-переносчик – эукариотный организм-реципиент) в популяции патогенных микроорганизмов из-за их спонтанного переноса от трансгенных растений.

- *Встраивание трансгена* может приводить к нежелательным воздействиям на геном организма, нарушить первичную структуру какого-либо хозяйствен-ного гена и, тем самым вызвать его инактивацию. В последствии это может привести к мутации;

- *Трансген может приводить к незапланированным изменениям метаболизма клетки.*

- *Проблемы безопасности селективных и маркерных генов.* Селективные и маркерные гены – важный молекулярный инструмент для отбора клеток, содержащих целевой ген и для анализа его экспрессии полученных таким образом трансгенных растений.

Опасения могут вызывать: токсичность ДНК селективного или маркерного гена; токсичность белкового продукта; возможность переноса к патогенным микроорганизмам.

Возникает ряд тревожных вопросов о применении современных технологий для создания биологического оружия. Сегодня ученые способны синтезировать любые последовательности ДНК. Возникает вопрос: смогут ли террористы воссоздавать вирусы, подобные оспе, или конструировать вирусы более сме-ртоносные, чем птичий грипп и геморрагическая лихорадка Эбола.

Существуют два подхода к оценке потенциального риска ГМО.

Первый – оценка опасности целевого продукта (или результата) генетической модификации. Неважно, как создана генетическая модификация: традиционной селекцией, скрещиваниями или генной инженерией. И если продукт генетической модификации сам по себе безопасен и рецепторный организм исходно полагается безопасным, то вероятность, что из-за данной ге-нетической модификации организм может стать опасным, игнорируется. Такой подход называется «ориентированным на продукт» ГМ.

Второй подход основан на всесторонней оценке того, не приобрел ли исходно безопасный реципиентный организм в процессе генетической модификации каких – либо потенциально опасных свойств. Этот подход принято называть «ориентированными на процесс».

Факты неблагоприятного воздействия трансгенов на организм человека и животных не свидетельствуют о порочности технологии создания ГМО как таковых. Актуальна проблема анализа пищевых и прочих рисков использования ГМО, необходима выработка норм экспертизы и тестирования новых сортов с учетом уже известных рисков и постоянного жесткого контроля ГМО по исходным, немодифицированным сортам. Оценка рисков всегда будет относительна – любые употребляемые нами продукты питания способны осуществлять разнообразные воздействия на организм, а в процессе производства любой пищевой продукции происходит вмешательство человека в окружающую природу.

Имеющиеся данные показывают, что есть уже немало доказанных случаев реальных пищевых рисков, связанных с использованием генетически модифицированных организмов по сравнению с исходными организмами.

11.09.2013 г. исполнилось 10 лет со дня вступления в силу в нашей стране **Картахенского протокола по биобезопасности к Конвенции о биологическом разнообразии** – важнейшего соглашения, регулирующего межгосударственные отношения в сфере безопасности генно-инженерной деятельности. Сторонами протокола являются 166 из 194 государств – членом ООН.

Цель – содействовать обеспечению надлежащего уровня защиты в области передачи, обработки и использования живых измененных организмов – результату применения современной биотехнологии и способных неблагоприятно воздействовать на сохранение и устойчивое использование биоразнообразия, с учетом рисков для здоровья человека и особым вниманием их трансграничному перемещению.

15. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

Использование культур животных клеток

Получение биотехнологических продуктов в культуре животных клеток:

<u>Продукт</u>	<u>Клетки или их источник</u>
СТГ	Опухоль гипофиза
Коллаген	Фибробласты
Гистамин	Опухоль из тучных клеток
Мукополисахариды	Фибробласты
Фактор роста нервной ткани	Нейробластома



Преимущества культур клеток в качестве модельных объектов:

1. Клетки в культуре **легко доступны для различных биохимических манипуляций**, при работе с ними исследуемые соединения (яды, гормоны, лекарственные препараты, косметические средства и т.д.) могут быть введены **в заданной концентрации и в течение заданного периода времени**; исчезает опасность того, что соединение метаболизируется печенью, запасается мышцами или экскретируется почками.

2. Исследователь может **изменять условия культивирования в определенных пределах**, что позволяет ему оценивать влияние на состояние клеток самых различных физических факторов (температуры, УФ-облучения и т.д.).

3. **Быстрота получения результатов**, т.к. рост клеток может быть оценен в течение короткого периода времени, например, по увеличению их числа или размера.

Метод культуры клеток – неотъемлемая составная часть генной, кле-

точной инженерии и др. направлений экспериментальной биологии.
Генная инженерия – совокупность методов, позволяющих выделять нужный ген из генома одного организма и вводить его в геном другого организма
Клеточная инженерия – конструирование клеток нового типа на основе их культивирования, гибридизации и реконструкции.

Клеточная инженерия – это конструирование специальными методами клеток нового типа. Она включает реконструкцию жизнеспособной клетки из отдельных фрагментов разных клеток, объединение целых клеток, принадлежавших различным видам (и даже относящихся к разным царствам — растениям и животным), с образованием клетки, несущей генетический материал обеих клеток и др. операции.

Клеточная инженерия используется в решении теоретических проблем биотехнологии, для создания новых форм растений, обладающих полезными признаками и устойчивых к болезням и т. п.

Направления практического использования культур растительных клеток:

1. Получение биологически активных веществ.
2. Клональное размножение растений.
3. Получение растений, оздоровленных от вирусной, бактериальной и грибной инфекций.
4. Ускорение селекционного процесса на основе методов клеточной инженерии.
5. Получение трансгенных растений.
6. Сохранения генофонда высших растений.

Направления практического использования культур животных клеток.

1. Получение биологически активных веществ.
2. Тестирование и изучение механизма действия различных веществ (гормонов, лекарственных препаратов, детергентов, косметических средств, инсектицидов, консервантов).
3. Клонирование животных.
4. Получение трансгенных животных.
5. Создание банков клеточных линий.

В медицине их используют при решении следующих задач:

- исследование механизмов перерождения нормальных клеток в опухолевые;
- изучение тканевой несовместимости и других иммунных реакций;
- в онкологии – для оценки противоопухолевых средств (культуры опухолевых клеток);
- реконструкция различных поврежденных тканей и органов путем трансплантации нормальных здоровых клеток, выращенных *in vitro*

В основе получения культуры клеток лежит обработка кусочков тканей энзимами, вызывающими распад межклеточного матрикса и высвобождение клеток.

Типы животных клеток, которые культивируют *in vitro*:

- элементы соединительной ткани (фибробласты, лимфоциты, клетки кости и хряща);
- мышечные ткани (скелетные, сердечные и гладкие мышцы);
- эпителиальные ткани (печень, легкие, почки и др.);
- клетки нервной системы;
- эндокринные клетки (надпочечники, гипофиз и др.);
- различные опухолевые клетки



- Первичные культуры (органные и диссоциированные);
- Перевиваемые культуры;
- Диплоидные культуры.

Культивирование *in vitro* органа или части органа, в которых сохраняются анатомическая связь и функционирование тканей, максимально приближенные к таковым в условиях *in vivo*, называется органной культурой.

1. В органной культуре долгое время сохраняются межклеточные взаимодействия.

2. Клетки ее поддерживают гистологическую и гистохимическую структуру. Различные компоненты ткани сохраняют пространственную взаимосвязь и функциональную активность. Сохранена строма незаменимая для поддержания роста и дифференцировки эпителия. Ткань здесь наиболее приближена к физиологической экспериментальной модели.

3. Приготовление органной культуры несложно.

4. Органная культура неспособна к размножению.

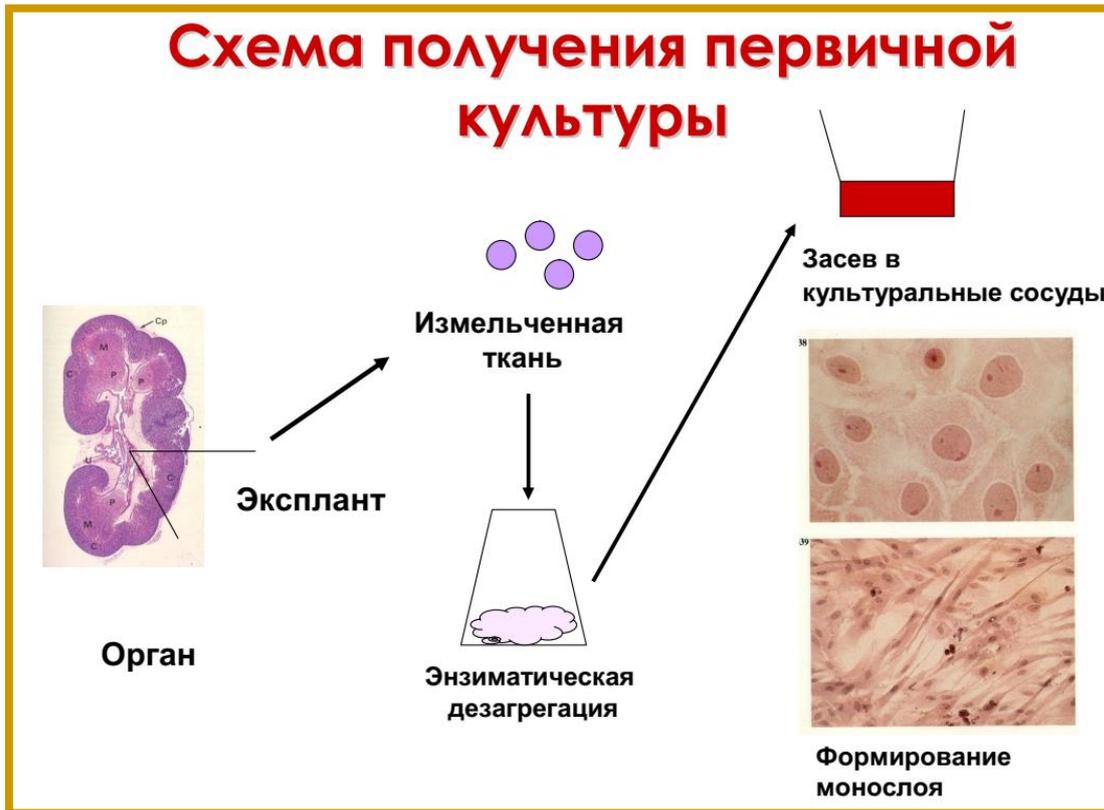
5. Эмбриональные органы и их зачатки растут *in vitro* также как и *in vivo*, сохраняя при этом чувствительность к гормонам и способны отвечать на их действие.

6. Культивирование органной культуры должно осуществляться в среде чистого O₂.

7. Культивирование ее ограничено по времени – не более нескольких месяцев

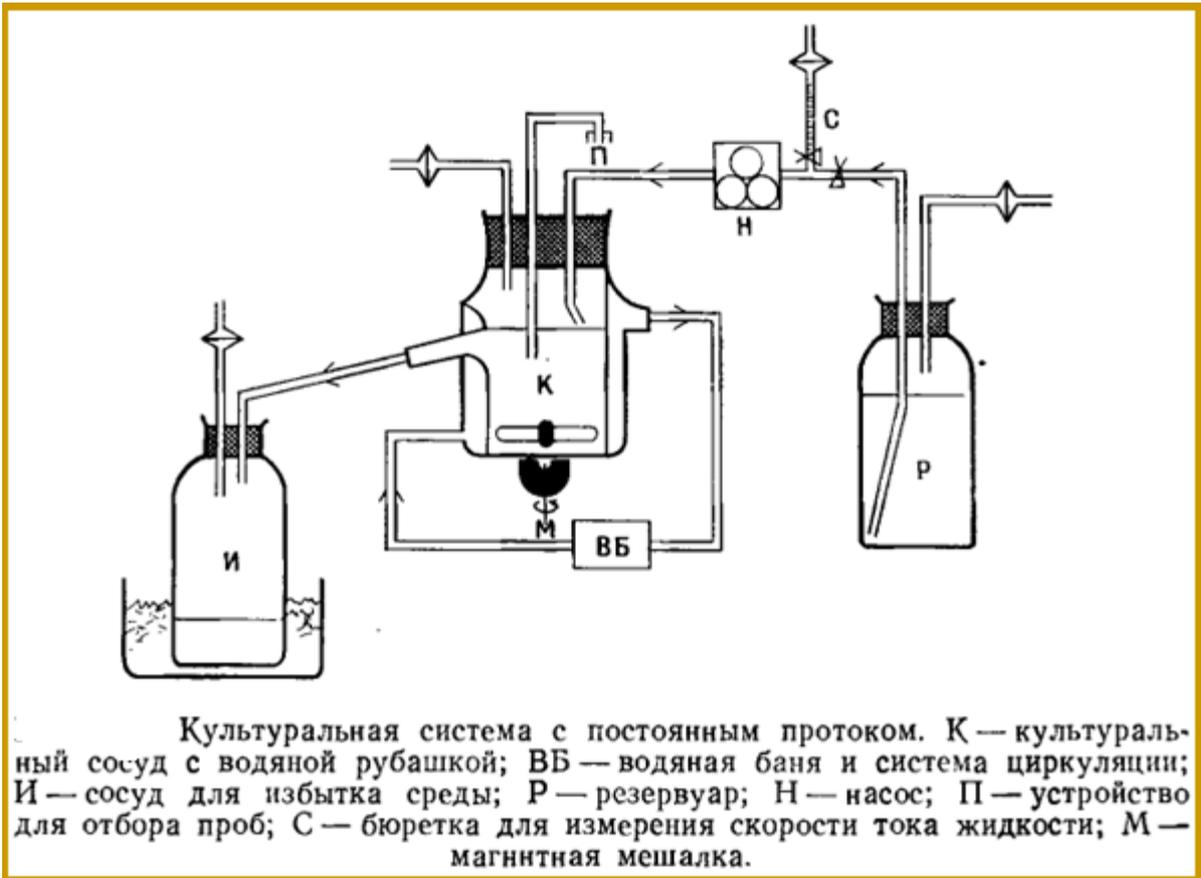
Первичные культуры клеток – культуры клетки, полученные

непосредственно из живого организма. Их готовят только перед применением, для длительного культивирования они непригодны. Можно получить первичную культуру из различных органов и тканей человека и животных, но лучше это удастся сделать из эмбриональных органов. Чаще используют почки, легкие, кожу, тимус, тестикулы эмбрионов или молодых животных. Эти культуры полностью сохраняют генотип и фенотип исходных клеток.



В изолированном контейнере (чаще пробирках или матрасах) размножающиеся клетки формируют клеточный монослой, и такой тип культуры клеток называют **однослойной культурой клеток**.

Отдельные типы клеток возможно культивировать во взвешенном состоянии - такой тип культуры клеток называют **суспензионной культурой**.



Культивирование в суспензионном состоянии проводят в специальных аппаратах, называемых биореакторами, и только тех типов культур, которые обладают способностью размножаться во взвешенном состоянии. Существуют биореакторы нескольких типов, отличающихся по принципу работы — биореакторы с *механическим механизмом перемешивания*, *газовихревые биореакторы*, в которых перемешивание осуществляется за счет воздушного потока, подаваемого через среду, а также *комбинированные биореакторы*.

Рабочий объем названных биореакторов может быть самым разным - от 2 до 28 000 л и даже больше.



Рисунок 59. - Верхняя часть биореактора Pierre Guerin Group объемом 28 000 л с



Рисунок 67. - Комплексный биореактор Pierre Guerin Group

Разновидностью суспензионного культивирования является **культивирование на микроносителях** – клетки размножаются в прикрепленном на поверхности мельчайших полимерных частиц состоянии, которые сами находятся во взвешенном состоянии. Для культивирования клеток в виде монослоя пригодны к использованию пробирки в наклоненном положении, либо же специальные матрасы различной площади (от 25 см² до 150 см²).

Сравнительная характеристика различных систем культивирования

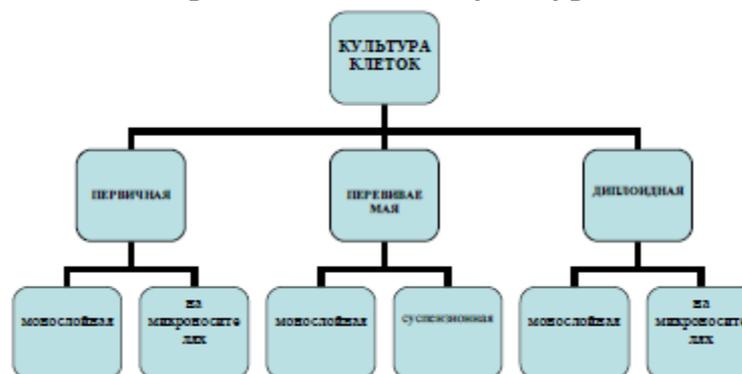
Непроточная культура	Проточная культура
Тип клеточной культуры, при котором клетки культивируются в неизменном объеме среды	Тип клеточной культуры, при котором клетки культивируются в объеме среды, при этом происходит постоянная смена среды.
При росте клеток происходит истощение питательных веществ с накоплением метаболитов.	Поддерживаются истинные гомеостатические условия.
Необходима периодическая замена среды на новую, вследствие чего происходят скачки в клеточном метаболизме.	Концентрация питательных веществ и метаболитов остаётся на постоянном уровне, вследствие постоянного вхождения в систему новых питательных веществ и удалением продуктов метаболизма.

	Монослойная культура	Суспензионная культура
С течением времени происходит прекращение пролиферации клеток, вследствие истощения среды.	Тип клеточной культуры, при котором клетки располагаются в один слой на специальной подложке, осуществляя тесные межклеточные контакты.	Тип клеточной культуры, при котором клетки располагаются в виде взвеси в ростовой среде.
	Данный тип культуры может использоваться для любого типа клеток.	Характеризуется высоким выходом клеток
	Обеспечивается высокая плотность клеток на единицу площади пространства.	
	Лёгкая смена среды и промывки клеток, т. к. клетки плотно прикреплены к субстрату.	
	Оптимальна при необходимости культивирования вирусов, для распространения вирусов через межклеточные контакты.	
	Недостатками является сложность определения и контроля pH, O₂, требуется большое пространство, трудности отбора клеток.	

Перевиваемые культуры клеток способны размножаться вне организма неопределенно длительное время. Их поддерживают путем пересевов из одного сосуда в другой с заменой питательной среды. Принято, что перевиваемой может считаться стабильная культура, которая пассировалась не менее 70 раз с 3-х дневными промежутками. Клетки имеют одинаковую форму, гетеро-плоидный набор хромосом (у первичных культур он диплоидный), стабильны в условиях роста в пробирке, могут обладать онкогенной активностью. Это ограничивает их использование при производстве вакцин.

Диплоидные культуры клеток – 75% клеток с кариотипом идентичный таковым клеток, из которых она выведена. По сути это перевиваемые культуры, но только с двойным (правильным) набором хромосом. В первых 50-60 пассажах такие культуры остаются диплоидными и их широко используют для решения ряда теоретических и практических задач биологии (приготовление биопрепаратов для человека, выделение онковирусов и др.). Они весьма жизнеспособны, не подвержены морфологическим изменениям, свободны от спонтанного вирусносительства и т.д.

Типы и разновидности культур клеток



Наиболее распространены в практической клеточной инженерии человека культуры **фибробластов**.

Фибробласты обладают комплексом особенностей, делающих их культуру удобным объектом исследования:

1. Легкость культивирования.
2. Являются клеточным элементом соединительной ткани, составляющей значительную часть массы тела человека.
3. Они составляют строю многих органов, являются важным участником их морфогенеза.
4. Создают все условия для микроокружения, необходимого для дифференцировки и функции специализированных клеток.
5. Имеют энзим моноаминоксидазу.
6. Содержат рецепторы к глюкокортикоидным гормонам, инсулину, нейромедиаторам.
7. Все изменения, возникающие при ведении культуры фибробластов легко контролируются и сводятся к минимуму, при создании соответствующих условий культивирования.
8. Фибробласты *in vitro* сохраняют важнейшие черты, свойственные клеткам в организме человека.

Стволовые клетки — это иерархия особых клеток живых организмов, каждая из которых способна впоследствии дифференцироваться особым образом (то есть получать специализацию и далее развиваться как обычная клетка).

Стволовые клетки способны асимметрично делиться, из-за чего при делении образуется клетка, подобная материнской (самовоспроизведение), а также новая клетка, которая способна дифференцироваться.

В **1908** году термин «стволовая клетка» был введен русским гистологом Александром Максимовым (1874-1928) на съезде гематологического общества в Берлине. Он постулировал существование стволовой кроветворной клетки. В 1981 г. американский биолог Мартин Эванс впервые выделил недифференцированные плюрипотентные линии стволовых клеток – бластоцисты мыши. В 1998 г. Д. Томпсон и Д. Герхарт выявили бессмертную линию эмбриональных стволовых клеток (ЭСК).

Корнем иерархии стволовых клеток является тотипотентная зигота. Первые несколько делений зиготы сохраняют тотипотентность и при потере целостности зародыша это может приводить к появлению монозиготных близнецов. К ветвям иерархии относятся плюрипотентные (омнипотентные) и мультипо-тентные (бластные) стволовые клетки.

Конечными элементами иерархии являются зрелые унипотентные клетки тканей организма. Нишами стволовых клеток называются места в ткани, где постоянно залегают стволовые клетки, делящиеся по мере надобности для дальнейшей дифференциации.

Стволовые клетки размножаются путем деления, как и все остальные клетки. Их отличие в том, что они могут делиться неограниченно, а зрелые клетки обычно имеют ограниченное количество циклов деления. В организме имеется ряд популяций стволовых клеток различной степени зрелости. В нормальном состоянии, чем более зрелой является клетка, тем меньше вероятность того, что она сможет превратиться в клетку другого типа.

В различных органах и тканях взрослого организма существуют частично созревшие стволовые клетки, готовые быстро дозреть и превратиться в клетки нужного типа. Они называются бластными клетками. Например, частично созревшие клетки мозга – это нейробласты, кости – остеобласты и так далее.

Стволовые клетки таят в себе невиданные возможности: от регенерации поврежденных органов и тканей до лечения заболеваний, не поддающихся лекарственной терапии. Наиболее универсальны эмбриональные стволовые (ES - embrionic stem) клетки.

Перспективы и проблемы использования стволовых клеток

Перспективы	Проблемы
Возможность регенерации повреждённой ткани и органа, при введении в очаг поражения ES стволовых клеток.	Плюрипотентность ES-клеток таит в себе много неожиданностей. Введенные клетки могут инициировать образование тератомы или тканей совсем другого типа чем нужно.
«Омоложение» организма на клеточном уровне.	Клетки-предшественники могут вызвать иммунную реакцию со стороны организма-хозяина. Подобно клеткам трансплантированных органов, они несут на своей поверхности антигены, воспринимаемые иммунной системой как сигнал к атаке.
Терапия нейродегенеративных заболеваний, инфаркта миокарда, дистрофий различного генеза.	Для создания банка клеток, в котором нашлись бы совместимые с организмом больного, потребуются миллионы

	эмбрионов, отбракованных в клиниках по искусственному оплодотворению.
Открытие механизмов образования раковых стволовых клеток и существенный прогресс в области онкологии.	Возможность возникновения мутации в ES-клетках, в результате чего они превратятся в раковые.
	Очень медленный рост стволовых клеток в культуре и сложности их культивирования.
	Количество стволовых клеток у эмбриона составляет 1 клетка на 10 тысяч, у человека в 60-80 лет — 1 клетка на 5-8 миллионов.

Однако, результаты первых тестов на возможность применения взрослых стволовых клеток *для лечения, в частности, сердечно-сосудистых заболеваний* весьма обнадеживают. Проведены успешные эксперименты на животных по применению производных ES-клеток *для лечения нейродегенеративных расстройств*, что, возможно, подтолкнет соответствующие клинические испытания на человеке.

Гибридная технология. Гибридные клетки (*гибридомы*) образуются в результате слияния клеток с различными генетическими программами, например, нормальных дифференцированных и трансформированных клеток. Примером являются гибридомы, полученные в результате слияния нормальных лимфоцитов и миеломных клеток. Эти гибридомы способны к синтезу специфических антител, а также к неограниченному росту в процессе культивирования.

Криосохранение – замораживание при сверхнизких температурах. Обычно его проводят в жидком азоте, при температуре $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Успех низкотемпературной консервации зависит от ряда факторов:

- вид и тип клеток,
- их концентрация в суспензии,
- состав среды для консервирования,
- вид и концентрация криопротектора,
- режим охлаждения и отогрева,
- способ реабилитации клеток после отогрева.



Рисунок 68. - Лаборатория криогенных аппаратов. В изолированном помещении располагаются вдоль стены аппараты газообразного азота, позволяющие сохранять культуры клеток при температуре – 150°С.

Использование культур растительных клеток

1. Клеточные технологии для получения экономически важных веществ растительного происхождения

Растения отличаются от бактерий и особенно животных поразительным многообразием синтетических процессов. Количество биологически активных соединений, синтезируемых растениями, огромно. Все они, как правило, относятся к продуктам вторичного (специализированного) обмена. Вторичные метаболиты характеризуются таксономической специфичностью. Основное их назначение заключается в обеспечении биохимической адаптации растений к существованию в биоценозах. Так, среди вторичных метаболитов обнаружены соединения с аллелопатическими, инсектицидными, фунгицидными, бактерицидными свойствами, а также фитоалексины и вещества, подобные гормонам животных.

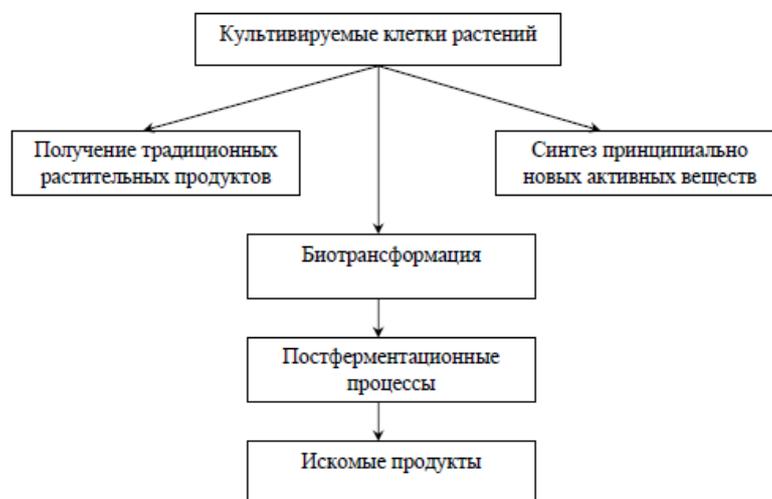
Особый интерес для человека представляют те биологически активные соединения, которые могут быть использованы в медицине, технике, пищевой и парфюмерной промышленности, сельском хозяйстве. Если для получения ценных БАВ традиционно использовались целые организмы (микроорганизмы, растения, животные), то современная биотехнология нацелена на клеточные технологии, основанные на культивировании свободных и иммобилизованных клеток.

Как альтернативные источники БАВ растительного происхождения клеточные культуры обладают следующими преимуществами:

- получение экологически чистых продуктов независимо от климата, сезона, погоды;
- создание клеточных линий-сверхпродуцентов путем генетических манипуляций;
- сохранение пула генов редких и исчезающих растений-продуцентов;
- возможность оптимизировать и стандартизировать условия выращивания;

– возможность автоматизации процессов.

Основные аспекты применения культур клеток растений в качестве продуцентов БАВ



Благодаря усилиям многих исследователей накоплено немало ценной информации о способности культивируемых растительных клеток синтезировать многие традиционные экономически важные продукты: терпеноиды, гликозиды, полифенолы, полисахариды, эфирные масла, необычные пептиды и специализированные белки, натуральные красители, стероиды, пряности, инсектициды, воски, витамины. Также доказана возможность культур клеток осуществлять биотрансформацию, то есть синтезировать некоторые БАВ из дешевых и доступных их предшественников. Эти «полупродукты» вторичных метаболитов не могут быть преобразованы химическим или микробиологическим путем, и только благодаря активности ферментов клеток растений в культуре происходит их превращение в ценный конечный продукт.

Перевод клеток в условия *in vitro* может также приводить к синтезу совершенно новых соединений с принципиально другим механизмом действия. Например, японские исследователи добились успехов в получении таких новых БАВ, как необычные пептиды, антиканцерогенные соединения, убихинон-10 и др.

Популяциям культивируемых *in vitro* растительных клеток присущи определенные особенности протекания процессов вторичного метаболизма. Важной их характеристикой является степень стабильности в отношении синтеза, транспорта и депонирования физиологически активных соединений. Высокая биосинтетическая способность может сохраняться в течение всего времени существования популяции. Однако известны примеры постепенного (в течение нескольких лет) увеличения числа клеток со сниженным синтезом метаболитов. В случае полной «нестабильности» клетки в популяции очень быстро теряют способность к синтезу вторичных метаболитов, что связано с прекращением *in vitro* экспрессии генов, участвующих в образовании БАВ.

В растительном организме синтез метаболитов, их транспорт и

отложение в запас зачастую разделены во времени и осуществляются в разных органах растения. Например, алкалоид никотин, который синтезируется в корнях табака, а уже оттуда поступает в листья, где и накапливается. В условиях *in vitro* все стадии вторичного метаболизма – от синтеза до депонирования – обычно проходят в одной клетке.

Эпибласты и млечники, в которых может осуществляться отложение различных веществ, являются редкими структурами в каллусных культурах.

Одной из особенностей популяций культивируемых растительных клеток является различная степень корреляции синтеза вторичных метаболитов с процессами дифференцировки. В организме растения вторичный метаболизм присущ только дифференцированным клеткам, специализированным органам и протекает только на определенных этапах их развития. Каллусные культуры зачастую характеризуются низким содержанием искомого вещества, что, по-видимому, вызвано отсутствием дифференциации ткани. Однако это неабсолютное правило.

Появляется все больше данных, что органогенез в культуре не является необходимым условием для биосинтеза вторичных метаболитов *in vitro*. Например, органогенез иногда сопровождается снижением содержания продуктов вторичного обмена веществ. Также неоднозначны данные о взаимосвязи их накопления с фазами ростового цикла клеточных культур. У многих видов при периодическом режиме выращивания вторичные метаболиты накапливаются в значительных количествах лишь при замедлении или остановке роста. Предполагается, что механизмы и условия, блокирующие деление клеток и активный рост, могут одновременно являться и механизмами активации, обеспечивающими синтез ферментов вторичного метаболизма. Однако известны такие культуры, у которых синтез продукта способствует росту клеток. В любом случае, на первом этапе культивирования стараются создать оптимальные условия для роста, то есть накопления биомассы, а затем исследуют влияние этих условий на биосинтез вторичных метаболитов.

Накопление вторичных метаболитов в культуре клеток растений зависит от ряда факторов. *Во-первых*, выход продукта определяется генотипом донорного растения, правильным выбором его ткани или органа для введения в культуру. В большинстве случаев это главное условие, определяющее качество получаемого продукта. Как правило, высокий выход продукта наблюдается в культурах, инициированных из высокопродуктивных растений. Выбор органа также имеет немаловажное значение. Например, содержание стероида диосгенина в культуре клеток *Dioscorea floribunda*, полученной из клубня, было на порядок выше, чем в культуре клеток, полученной из побега.

Во-вторых, на выход продукта влияет гетерогенность культивируемых клеток по способности к синтезу вторичных метаболитов. Как отмечалось ранее, у культивируемых *in vitro* клеток могут происходить значительные изменения вторичного метаболизма по сравнению с интактными растениями. Одной из причин изменения интенсивности вторичного метаболизма в

культуре клеток выступает генетическая их гетерогенность. Вместе с тем гетерогенность клеточной популяции может играть положительную роль, позволяя отбирать линии клеток с повышенным синтезом искомого продукта или синтезирующие совершенно новые вещества.

В-третьих, в качестве факторов, оказывающих влияние на накопление вторичных метаболитов в культуре клеток растений, выступают состав питательной среды и физические условия культивирования.

Важнейшими компонентами питательных сред, эффективно регулируемыми и первичный, и вторичный обмен клеток, являются фитогормоны. Показано, что характер влияния фитогормонов зависит от вида растения, природы вторичного соединения, клеточного штамма и т.д. Поэтому результаты экспериментов по выяснению воздействия фитогормонов на синтез вторичных метаболитов крайне противоречивы. При изучении влияния 146 соединений с ауксиновой активностью на рост и образование антрахинонов в культуре клеток моринды лимоннолистной было установлено, что многие регуляторы поддерживали хороший рост клеток, но только два: НУК и 2,3,6-трихлорбензойная кислота, наряду со стимуляцией роста, способствовали образованию антрахинонов.

Увеличение выхода вторичных метаболитов во многих случаях наблюдается при повышении концентрации сахарозы в питательной среде. Вместе с тем высокое ее содержание приводит к возрастанию осмотического потенциала, что может оказывать неблагоприятное влияние на метаболизм культивируемых клеток. Нельзя не учитывать, что увеличение содержания сахарозы в среде удорожает производство, поэтому поиск дешевых углеводных добавок остается актуальным.

Среди других компонентов питательной среды регулирующее воздействие на накопление вторичных метаболитов могут оказывать источники азота, фосфора и калия. Однако характер их влияния значительно различается в зависимости от вида растения и синтезируемого соединения. Так, если у одних культур присутствие органических форм азота в среде тормозит накопление вторичных метаболитов, то у других – повышает их синтез. Установлено, что недостаток фосфора в среде стимулирует синтез многих БАВ, хотя очень низкие его концентрации будут подавлять процессы энергетического метаболизма и, следовательно, снижать накопление вторичных метаболитов.

Положительный эффект на биосинтез вторичных веществ оказывает наличие в среде некоторых предшественников самих искомым соединений. Это могут быть аминокислоты (глутамат, фенилаланин, лейцин, орнитин и др.) и органические кислоты (ацетат, сукцинат, шикимовая и др.). Однако не всегда их внесение вызывает увеличение выхода продукта. Отсутствие желаемого эффекта можно объяснить разными причинами: предшественники не поглощаются клетками, происходит их распад в процессе приготовления и стерилизации сред или же они переходят в другие физиологически неактивные формы. Не исключено, что некоторые предшественники могут оказывать побочные эффекты на рост культуры, в частности, ингибировать

его.

Во многих случаях буферная емкость питательных сред является достаточно низкой, поэтому величина исходного рН при культивировании быстро сдвигается на несколько единиц, а это, в свою очередь, сказывается на биосинтетических свойствах культивируемых клеток. Например, в культуре клеток *Ipomea*, которая биотрансформирует триптофан в различные метаболиты индольной природы, выход такого продукта как триптанол значительно увеличивается при рН 6,3 и полностью подавляется при рН 4,8. Поэтому поддержание кислотности питательной среды на определенном уровне также является важным фактором, от которого зависит образование БАВ в культуре. Следует отметить, что оптимизация состава питательной среды является ключевым условием для повышения выхода продукта. В результате подобных исследований разрабатываются так называемые продукционные среды, на которых культивируемые клетки синтезируют значительное количество вторичных метаболитов.

Физическими факторами, влияющими на накопление БАВ клетками, являются освещенность, температура, аэрация и режим перемешивания в случае суспензии, а также состав газов в колбах. Стимулирующее действие света на образование вторичных соединений в культуре клеток показано на примере каротиноидов, эфирных масел, коричных масел, флавоноидов, пластохинонов, антоцианов, катехинов, алкалоидов, витаминов. При этом имеет значение и качество света. Однако в некоторых случаях свет оказывал ингибирующее действие, подавляя синтез вторичных метаболитов.

Данных о влиянии температуры на рост и процессы биосинтеза в клеточных культурах очень мало, но поскольку температура влияет на вторичный метаболизм интактных растений, исследования в этом направлении являются достаточно необходимыми. Тем более, что оптимумы температуры для роста культуры клеток и процессов биосинтеза БАВ не всегда совпадают.

Для получения вторичных метаболитов из суспензионных культур важны также аэрация и скорость перемешивания. Так, в культуре клеток табака увеличение скорости перемешивания приводило к повышению выхода никотина.

В целом следует отметить, что накопление клетками продуктов вторичного метаболизма является результатом динамического равновесия между биосинтетическим, биотрансформационным и биodeградационным процессами. Влияние внешних и внутренних факторов на каждый из этих процессов имеет сложный характер, и зачастую из-за отсутствия фундаментальных знаний с трудом поддается прогнозированию. Поэтому следует признать оправданным тот эмпирический подход при изучении влияния факторов культивирования на накопление вторичных веществ, который продолжает использоваться и в настоящее время.

Биотехнологическое производство вторичных метаболитов растений осуществляется преимущественно при культивировании клеточных суспензий. Очень большое значение для их роста и образования целевых

продуктов имеют технические характеристики систем культивирования.

Длительное время для создания технологий промышленного выращивания суспензионных культур применялась аппаратура, разработанная для микробиологической промышленности. Однако исследования последних лет показали, что растительные клетки в силу своих специфических особенностей требуют особых сосудов для культивирования. Клетки растений в десятки, сотни раз крупнее клеток бактерий и грибов, кроме того, их размеры меняются в процессе онтогенеза. Если в начале экспоненциальной фазы роста они мелкие и плотные, то в стационарной фазе роста они сильно увеличиваются в размерах и вакуолизируются. Чем крупнее становится клетка, тем больше возрастает опасность ее механического повреждения. В то же время клетки растений крупные и тяжелые требуют эффективного перемешивания.

В зависимости от принципа перемешивания культуральной жидкости биореакторы подразделяются на два больших типа по своей конструкции. В биореакторах первого типа перемешивание осуществляется только путем аэрирования воздухом. При этом в барботажных биореакторах – за счет поднимающихся пузырьков воздуха, а в аэролифтных – с применением специальной конструкции с внутренним цилиндром, создающей градиент плотности суспензии (рис. 69). Для биореакторов второго типа характерно наличие механических перемешивающих устройств.

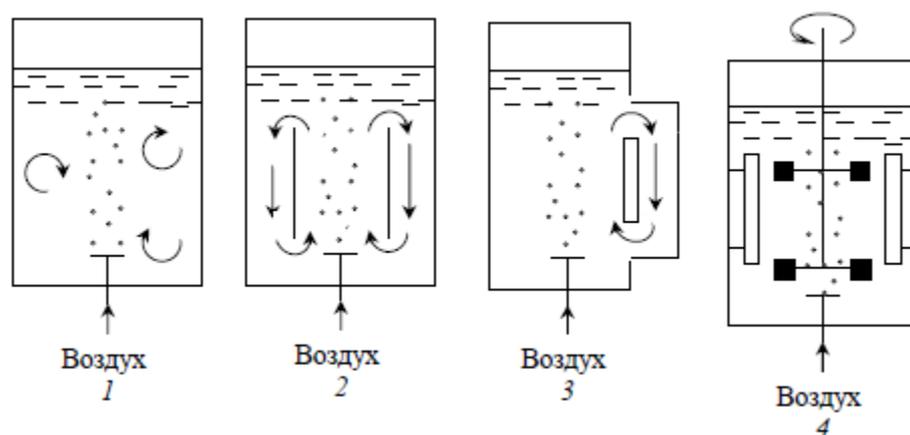


Рисунок 69. - Принципиальные схемы биореакторов, наиболее часто применяемых для культивирования суспензионных культур:
1 – барботажный биореактор; 2 – аэролифтный биореактор; 3 – биореактор вынесенной циркуляционной петлей; 4 – биореактор с механически перемешивающим устройством; В – воздух.

Использование биореакторов для исследования популяций растительных клеточных имеет следующие преимущества:

– большой объем культивационного сосуда позволяет, не внося существенных возмущений, отбирать пробы большого объема, что очень важно при анализе вторичных метаболитов, часто содержащихся в очень низких концентрациях;

– возможность управления процессом культивирования по определенному алгоритму на основе показаний датчиков, установленных в биореакторах.

Вместе с тем культивирование клеточных суспензий в биореакторах связано и с некоторыми проблемами:

– оседанием клеток вследствие недостаточного перемешивания, что приводит к появлению «мертвых» зон в сосудах, в которых происходит быстрое накопление и старение клеток;

– увеличением вязкости суспензии вследствие роста биомассы, приводящим к адгезии – прилипанию клеток друг к другу, поверхности культурального сосуда, погруженных в него мешалок и датчиков;

– образованием в верхней части сосуда «корки» или «безе», состоящей из полисахаридов, белков, слипшихся клеток и снижающей эффективность перемешивания, что в конце концов может привести культуру к гибели.

В настоящее время наиболее приемлемым способом получения больших количеств вторичных метаболитов растений является *двустадийное культивирование*. Его первая стадия связана с образованием больших количеств биомассы культивируемой суспензии, а вторая предполагает создание условий для активного биосинтеза необходимых продуктов. Обеспечив благоприятные условия культивирования на обеих стадиях *in vitro* можно добиться получения выхода вторичного метаболита в количестве, синтезируемом *in vivo*, а иногда и выше.

Большой интерес представляет также развитие методов иммобилизации культивируемых клеток и биотрансформации ими метаболитов. Суть иммобилизации состоит в заключении живых клеток в определенный носитель. Затем через носитель с клетками пропускают питательную среду. При этом клетки прекращают рост, но могут достаточно долго оставаться живыми и продуцировать необходимые вещества.

Клетки могут быть иммобилизованы 4 способами:

– иммобилизация в инертном субстрате, т.е. обволакивание клеток одной из различных цементирующих сред (альгинат, агар, полиакриламид, коллаген или комбинация гелей);

– адсорбция клеток на инертный субстрат;

– адсорбция клеток на инертном субстрате с помощью биологических макромолекул;

– ковалентное связывание клеток с каким-либо инертным субстратом типа карбоксилметилцеллюлозы.

Вокруг физически неподвижных иммобилизованных клеток могут циркулировать большие объемы питательной среды, регулируя состав которой, замедляют рост клеток и тем самым повышают выход вторичных продуктов.

Поскольку клетки в иммобилизованном виде культивируются длительное время, то для этого используются клетки, которые сами

естественным путем, секретируют необходимые метаболиты в питательную среду или могут быть индуцированы к такой секреции какими-либо приемами, например воздействием низких температур и растворителей. Клетки, которые накапливают искомый продукт внутри, например, в вакуолях или пластидах, не пригодны для иммобилизации.

Иммобилизованные клетки могут быть использованы не только для синтеза, но и для биотрансформации различных соединений. Очень часто растения или культуры клеток растений не доводят синтез метаболита до наиболее важного продукта, и тогда можно использовать процесс биотрансформации. В качестве примера можно привести использование суспензии клеток наперстянки, синтезирующей дигитоксин, тогда как для медицинских целей нужен дигоксин.

Сердечный гликозид дигоксин обладает большим терапевтическим эффектом по сравнению с дигитоксином, которого в растениях содержится значительно больше. Дигоксин отличается от дигитоксина лишь по наличию дополнительной гидроксильной группы.

Недифференцированные культуры клеток наперстянки шерстистой не образуют сердечных гликозидов, но могут осуществлять определенную реакцию биотрансформации субстратов, добавленных в питательную среду.

Биотрансформация необходима для гликозилирования фенольных продуктов корня женьшеня *in vitro*. Культура клеток женьшеня корневого происхождения активно трансформирует фенольные вещества (гликозилирует и гептозилирует), модифицирует ароматические карбоксилаты. Другим примером служит биотрансформация монотерпеновых соединений (компонентов эфирных масел) культурами клеток разных видов мяты. Путем биотрансформации можно значительно изменить качественный состав компонентов эфирного масла мяты. В частности, эффективна биотрансформация пулегона в более ценные компоненты (ментол) в культуре клеток *Mentha canadensis*.

Таким образом, использование суспензионных культур для синтеза вторичных метаболитов в промышленных масштабах имеет большие перспективы. Работа по созданию клеточных технологий для получения вторичных метаболитов в настоящее время включает следующие этапы:

1. Экономически обоснованный выбор объекта. Растения, выбранные для введения в культуру, должны содержать значительные количества экономически важных вторичных соединений. Особенно это относится к исчезающим видам растений.

2. Первичное введение тканей в культуру. Для этих целей отбираются отдельные растения, обладающие наибольшим содержанием искомого вещества. Обычно вначале получают каллусы на твердой среде.

3. Биохимическое изучение биомассы по качественному и количественному составу вторичных метаболитов. Определение очень низких концентраций метаболитов в медленно растущих клетках представляет большую трудность. Поэтому в качестве экспресс-методов оценки продуктивности каллусных культур в последнее время применяют

радиоиммунохимический и иммуноферментный методы. Последний имеет преимущества благодаря более высокой скорости проведения анализов и возможности их автоматизации.

4. Оптимизация сред и параметров выращивания. Для реализации генетической информации, детерминирующей вторичный обмен, требуются специфические условия. Поскольку нет твердой уверенности в том, что используемые питательные среды полностью отвечают потребностям клеток, в каждом конкретном случае приходится подбирать состав среды и определять влияние других факторов, опираясь на имеющийся опыт. Эта задача еще более усложняется при переводе культуры в жидкую среду, так как при этом следует учитывать влияние факторов аэрации и перемешивания.

5. Создание продуктивных штаммов клеток. Получение гомогенной популяции клеток с высоким содержанием тех или иных вторичных веществ – сложная задача, так как популяции длительно культивируемых клеток даже полученные клонированием одной высокопродуктивной клетки, могут терять способность к синтезу ценного соединения. Для поддержания на высоком уровне способности культуры к видоспецифическим биосинтезам, помимо оптимизации условий выращивания, требуются значительные усилия, включая проведение с ней генетических манипуляций и клеточную селекцию. Для организации рентабельного крупномасштабного производства на основе клеточной технологии нужны мутанты, синтезирующие гормоны, нетребовательные к питательным средам, а также устойчивые к осмотическому и механическому стрессу. Наиболее эффективным приемом создания продуктивных штаммов является искусственное конструирование клеток методами клеточной и генной инженерии, которым принадлежит будущее.

6. Первичное использование лучших штаммов в суспензионной культуре. Каллусные клетки, первоначально полученные на твердой среде, переводят в жидкую среду. Изменение режима культивирования не должно приводить к потере штаммом своих положительных качеств, т. е. штамм должен быть устойчив к стрессовым условиям культивирования. Особенно это касается момента переноса клеток из условий лабораторного эксперимента в небольших колбах в ферментеры крупных размеров.

7. Выращивание продуктивной и устойчивой культуры в условиях, приближающихся к производственным, в ферментерах с последующим увеличением их емкости. Если в таких полупромышленных условиях культивируемые клетки сохраняют высокие скорости роста и биосинтеза искомого вещества, накапливают его без деградации и в значительных количествах выделяют в среду, то такой штамм пригоден для организации крупномасштабного производства. Кроме того, важным качеством штамма является его генетическая стабильность.

8. Составление технического регламента на производство биомассы клеточной суспензии и его оценка. Производственная технология требует соответствующей аппаратуры, которой располагает, в частности, Япония. Так, в 20000-литровом ферментере в непрерывной культуре в течение трех

месяцев выращивались клетки табака, продуцировавшие убихинон с продуктивностью по биомассе 5,582 г/л в день. Там также налажено крупномасштабное производство и других вторичных метаболитов.

В настоящее время в разных странах для получения экономически важных веществ используются культуры клеток около ста видов растений, среди которых – женьшень, раувольфия змеиная, наперстянка шерстистая и пурпурная, диоскорея дельтовидная, воробейник, беладонна, паслен дольчатый, дурман обыкновенный, ландыш майский, клещевина, агава, амми зубная, мак снотворный и др.

Клональное микроразмножение – это использование техники *in vitro* для быстрого получения неполовым путем растений, идентичных исходному. По своей сути микроразмножение аналогично вегетативному типу размножения растений с той лишь разницей, что оно протекает в пробирке в условиях *in vitro*, где из клеток изолированных тканей в итоге можно получить достаточно большое количество растений. Асептические условия и соответствующие питательные добавки позволяют в случае необходимости уменьшить размер экспланта до нескольких миллиметров.

В настоящее время число видов растений, которые можно клонировать «в пробирке» уже составляет около одной тысячи. Хотя метод микроразмножения растений является довольно трудоемким и затратным, в ряде случаев на его основе уже стало возможным создавать экономически рентабельные технологии.

Этот метод имеет ряд преимуществ перед существующими традиционными способами размножения:

- высокий коэффициент размножения (105–106 – для травянистых, цветочных растений, 104–105 – для кустарниковых древесных, 104 – для хвойных);
- возможность проведения работ в течение года и экономия площадей, необходимых для выращивания посадочного материала;
- получение генетически однородного посадочного материала;
- освобождение растений от вирусов за счет использования меристемной культуры;
- ускорение перехода растений от ювенильной к репродуктивной фазе развития;
- сокращение продолжительности селекционного процесса;
- получение растений, трудно размножаемых традиционными способами;
- возможность автоматизации процесса выращивания.

Области применения клонального микроразмножения разнообразны и имеют тенденцию к расширению:

- в селекции для поддержания и размножения растений с уникальными генотипами;
- для быстрого размножения новых и уже существующих сортов;

- массового получения оздоровленного посадочного материала у растений, подверженных вирусным заболеваниям;
- для быстрого размножения некоторых гетерозиготных садовых культур, обычно размножающихся семенами и расщепляющихся при скрещивании;
- для быстрого клонального размножения *in vitro* лучших экземпляров взрослых древесных растений, разведение и селекция которых осуществляется медленно вследствие длительности процесса полового размножения;
- для сохранения редких и исчезающих видов.

Основное требование к объектам, которые используются для микроклонального размножения, это сохранение генетической стабильности на всех этапах онтогенеза. Этому требованию удовлетворяют апексы и пазушные почки стеблевого происхождения.

Для микроклонального размножения также могут быть использованы меристематические ткани и изолированные органы, способные давать адвентивные почки. Такие почки могут развиваться на корнях, побегах и листьях. Например, африканская фиалка размножается с помощью адвентивных почек, образующихся на листовых черешках. Разработан метод, с помощью которого *in vitro* в результате использования отрезков размером 2 мм, можно получить до 20 000 проростков из каждого черешка.

Существует много методов клонального микроразмножения, и различными авторами предлагаются разные системы их классификации. Наиболее распространенной является классификация, согласно которой микроклональное размножение может осуществляться за счет:

- активации развития уже существующих в растении меристем (апекса стебля, пазушных и спящих почек, интеркалярных зон стебля);
- индукции адвентивных почек непосредственно тканями экспланта;
- индукции соматического эмбриогенеза;
- дифференциации адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной тканях (рис. 70).

Основной метод, используемый при клональном микроразмножении растений, – *это активация развития уже существующих в растении меристем*. Он основан на снятии явления апикального доминирования, что может быть достигнуто следующими путями:

- а) удалением верхушечной меристемы стебля и последующим микрочеренкованием побега на безгормональной среде;
- б) добавлением в питательную среду веществ цитокининового типа действия, индуцирующих развитие многочисленных пазушных побегов.

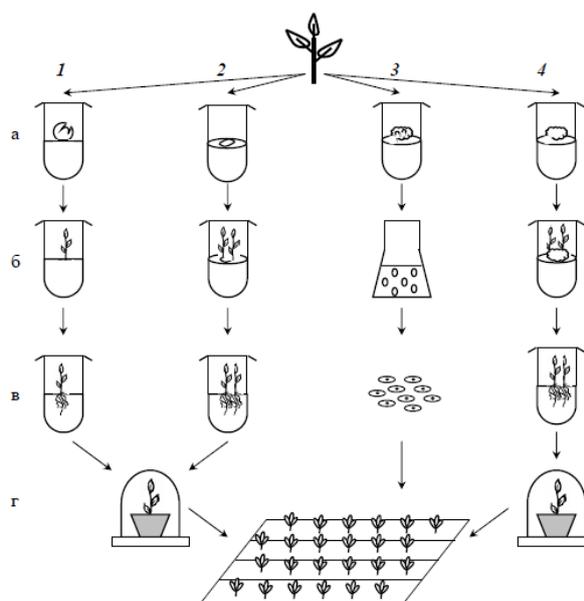


Рисунок 70. - Схема клонального микроразмножения растений:
1 – активация развития меристемы; 2 – образование адвентивных почек непосредственно на первичном экспланте; 3 – индукция соматического эмбриогенеза вкалусе и суспензионной культуре; 4 – образование адвентивных почек в каллусной ткани: а – получение стерильной культуры; б – формирование микропобегов и развитие соматических эмбриоидов; в – укоренение микропобегов и образование искусственных семян; г – перевод растений–регенерантов в тепличные условия последующей высадкой в поле

Процесс клонального микроразмножения можно разделить на несколько этапов:

1-й этап – выбор растения донора, изолирование и стерилизация экспланта, создание условий для его роста на питательной среде *in vitro*;

2-й этап – собственно размножение, осуществляемое одним из четырех перечисленных выше способов;

3-й этап – укоренение размноженных побегов;

4-й этап – высадка растений–регенерантов в почву.

На первом этапе необходимо добиться получения хорошо растущей стерильной культуры. При этом, как правило, используют среду, содержащую минеральные соли по прописи Мурасига и Скуга, а также различные биологически активные вещества и стимуляторы роста (ауксины, цитокинины) в различных сочетаниях в зависимости от объекта. Продолжительность первого этапа – от 1 до 2 месяцев.

На втором этапе важно достигнуть получения максимального количества мериклонов. Как и на первом этапе, используют питательную среду по рецепту Мурасига и Скуга. Основную роль при подборе оптимальных условий культивирования эксплантов играют соотношение и концентрация внесенных в питательную среду цитокининов и ауксинов. Из цитокининов наиболее часто используют БАП в концентрациях от 1 до 10 мг/л, а из ауксинов – ИУК и НУК в концентрациях до 0,5 мг/л. При длительном культивировании растительных тканей в питательных средах с

повышенным содержанием цитокининов (10 мг/л) происходит постепенное накопление их в тканях выше необходимого физиологического уровня, что приводит к формированию растений с измененной морфологией.

Третий этап является наиболее трудоемким, поскольку от него во многом зависит успех клонального микроразножения. На данном этапе, как правило, меняют основной состав среды. Уменьшают в два, а иногда и в четыре раза концентрацию минеральных солей в среде Мурасига и Скуга, снижают концентрацию сахара до 0,5–1 % и полностью исключают цитокинины, оставляя лишь ауксины. В качестве стимулятора корнеобразования используют ИМК, ИУК или НУК.

Укоренение микропобегов проводят двумя способами:

– выдерживание микропобегов в течение 2–24 ч в стерильном концентрированном растворе ауксина (20–50 мг/л) с последующим их культивированием на агаризованной среде без гормонов или непосредственно в подходящем почвенном субстрате (импульсная обработка);

– культивирование микропобегов в течение 3–4 недель непосредственно на питательной среде, содержащей ауксин в невысоких концентрациях (1–5 мг/л).

В последнее время предложен пока еще мало практикуемый метод укоренения пробирочных растений в условиях гидропоники. Этот метод позволяет значительно упростить этап укоренения и одновременно получать растения, адаптированные к естественным условиям.

Пересадка растений-регенерантов в субстрат является ответственным этапом, завершающим процесс клонального микроразмножения. Наиболее благоприятное время для пересадки пробирочных растений – весна или начало лета. Растения с двумя–тремя листьями и хорошо развитой корневой системой осторожно вынимают из колб или пробирок пинцетом с длинными концами или специальным крючком.

Корни отмывают от остатков агара и высаживают в почвенный субстрат, предварительно простерилизованный при 85–90 °С в течение 1–2 ч. Горшочки с растениями помещают в теплицы с регулируемым температурным режимом (20–22 °С), освещенностью не более 5 тыс. лк и влажностью 65–90 %. Для лучшего роста растений создают условия искусственного тумана. В тех случаях, когда нет возможности создать такие условия, горшочки с растениями накрывают стеклянными банками или полиэтиленовыми пакетами, которые постепенно открывают до полной адаптации растений.

Процесс адаптации пробирочных растений к почвенным условиям является наиболее дорогостоящей и трудоемкой операцией. Нередко после пересадки растений в почву наблюдается остановка в росте, опадение листьев и их гибель. Это связано, в первую очередь, с тем, что у пробирочных растений нарушена деятельность устьичного аппарата, вследствие чего происходит потеря большого количества воды. Во-вторых, у

некоторых растений в условиях *in vitro* не происходит образования корневых волосков, что приводит, в свою очередь, к нарушению поглощения воды и минеральных солей из почвы. Поэтому целесообразно на третьем и четвертом этапах клонального микроразмножения применять искусственную микоризацию растений (для микотрофных), учитывая их положительную роль в снабжении растений минеральными и органическими веществами, водой, биологически активными соединениями, а также в защите растений от патогенов.

При разработке методов клонального микроразмножения растений необходимо учитывать влияние генетических, физиологических, гормональных и физических факторов. Это связано с тем, что методика, разработанная для определенного клона одного вида не всегда может быть применена для размножения других представителей этого вида и тем более растений другого вида.

Гормональный баланс питательной среды – немаловажный фактор, влияющий на успех клонального микроразмножения. При высоком соотношении цитокининов к ауксинам происходит развитие пазушных меристем или образование адвентивных почек, при низком – индуцируется корнеобразование, при промежуточных значениях наблюдается образование и пролиферация каллуса.

На клональное микроразмножение и рост растений также *влияет кислотность питательной среды, интенсивность освещения, спектральный состав света, температурный режим и др.* Для повышения коэффициентов размножения необходимо каждому виду с учетом его естественного ареала произрастания подбирать индивидуальные условия культивирования.

В настоящее время клональное микроразмножение рассматривается как новый перспективный метод вегетативного размножения растений. Во многих странах мира биоиндустрия микроразмножения поставлена на промышленную основу и представлена десятками активно функционирующих предприятий. Например, во Франции 94 % всей продукции цветочных культур получают методом культуры изолированных тканей. В США около 100 коммерческих предприятий получают посадочный материал декоративных, овощных, полевых, плодовых и лесных культур методом клонального микроразмножения.

Ведущим производителем оздоровленного посадочного материала цветочных растений является Голландия, а подвоев яблони, сливы и персика – Италия.

Культура изолированных клеток и тканей в селекции и генной инженерии растений

Селекционная практика основывается на двух принципиальных подходах: создание генетического разнообразия и отбор желаемых генотипов. Клеточные технологии предлагают принципиально новые пути для увеличения генетического разнообразия и скрининга форм с искомыми признаками.

Существующие методы культивирования изолированных клеток и тканей растений *in vitro* можно разделить на две группы по их использованию с целью создания растений с новыми полезными признаками (табл. 3). Первая группа методов – это технологии для облегчения и ускорения селекционного процесса. Они не подменяют обычную селекцию, а служат ей. Вторая группа – технологии, предназначенные для создания генетического разнообразия исходных форм для селекции. Использование данных методов ведет к самостоятельному, независимому от традиционных методов селекции, получению новых форм и сортов растений.

Таблица 3. – Клеточные технологии в селекции растений

Для облегчения и ускорения селекционного процесса	Для создания генетического разнообразия и скрининга генотипов с важными признаками
Оплодотворение <i>in vitro</i> Культура незрелых зиготических зародышей Регенерация растений из тканей летальных гибридов Экспериментальная гаплоидия Клональное микроразмножение новых сортов, гибридов, линий (включая создание искусственных семян)	Использование соматоклональных вариантов Получение индуцированных мутантов на клеточном уровне Клеточная селекция Гибридизация соматических клеток Перенос чужеродных цитоплазматических генов Адресованный перенос ядерных генов

Клеточные технологии в селекции растений

Особое место, как в селекции, так и в генетике занимает отдаленная гибридизация. Скрещивание представителей культурных и дикорастущих видов, позволяет не только улучшать существующие сорта, расширять ареал их возделывания, но и создавать совершенно новые, высокоценные формы, сорта и даже виды растений. Ни один другой метод не позволяет так обогащать генофонд культурных растений как отдаленная гибридизация. Однако при использовании данного метода экспериментатор сталкивается с проблемой нескрещиваемости из-за прогамной и постгамной несовместимости.

Прогамная несовместимость – физиологическая несовместимость партнеров при отдаленном скрещивании, проявляющаяся на этапе до оплодотворения. Она может быть обусловлена физиологическими (несоответствие во времени созревания пыльцы отцовского растения или отсутствие секрета рыльца пестика материнского растения), а также морфологическими причинами (различие партнеров по длине столбика пестика и пыльцевой трубки; блокирование роста трубки на разных этапах ее пути от рыльца пестика до микропиле семязпочки вследствие тканевой несовместимости партнеров).

Основной способ преодоления прогамной несовместимости – *оплодотворение in vitro*. Метод заключается в совместном культивировании пыльцы и неоплодотворенных семязпочек, которое может осуществляться двумя различными способами. В первом случае столбик пестика срезается, завязь помещается на питательную среду, и на нее наносят готовую пыльцу.

Второй вариант данного метода предполагает вскрывание завязи и перенос на питательную среду кусочков плаценты с семяпочками, вблизи которых или непосредственно на их поверхности культивируется готовая пыльца. Визуально определить прошло ли оплодотворение *in vitro* можно по быстрому увеличению размеров семяпочек. Сформировавшийся зародыш, как правило, не переходит в состояние покоя, а сразу прорастает и дает начало гибридному поколению. Опыление *in vitro* хорошо удается для растений семейства маковых, гвоздичных, пасленовых (табак, петуния), у которых в завязях имеются многочисленные семяпочки.

Постгамная несовместимость – несовместимость таксономически отдаленных партнеров, которая наблюдается после оплодотворения, и приводит к образованию щуплых невсхожих семян.

Физиологические причины постгамной несовместимости заключаются в несоответствии темпов развития зародыша и эндосперма либо непригодности (токсичности) метаболитов тканей материнского растения для питания зародыша. Способ их преодоления – культивирование незрелых гибридных зародышей на питательной среде. Постгамная несовместимость может быть обусловлена и генетическими причинами, которые выражаются в аномалиях развития органов зародыша или молодого проростка. Для их преодоления используется шунтирование нормального развития, его замена получением гибридной каллусной ткани из живых тканей проростка или зародыша и регенерация растений из каллусных клеток.

Выращивание зародышей на искусственной питательной среде называется **эмбриокультурой**. В зависимости от стадии развития могут быть изолированы недостаточно дифференцированные или вполне сформировавшиеся зародыши. Среда для выращивания зрелого зародыша может быть простой, без добавок физиологически активных веществ. Для культивирования недифференцированных зародышей требуются более сложные питательные среды, содержащие не только витамины и стимуляторы роста, но и дополнительные трофические факторы (набор аминокислот, необходимые сахара, осмотики типа сорбита и маннита, растительные экстракты неопределенного состава).

Преодоление постгамной несовместимости, обусловленной генетическими причинами, как уже отмечалось, осуществляется путем введения промежуточного этапа получения гибридного каллуса и растений–регенерантов на его основе. Этот подход впервые был применен для получения гибридных растений табака при межвидовом скрещивании *Nicotiana tabacum* с диким видом *Nicotiana occidentalis*. В результате этого скрещивания удалось получить *гибридные семена*, но проростки гибли на стадии семядолей из-за отмирания первичного корня и остановки роста. Индукция образования каллусной ткани из семядолей и гипокотилей гибридных проростков, а затем и органогенеза в каллусах позволила получить сотни гибридных растений.

Каллусная ткань из гибридных растений может также служить для получения вариантных форм. Так, из одного гибридного зародыша,

возникшего при скрещивании ячменя и пшеницы, было получено более сотни регенерантов. У половины из них отмечались различия по морфологии и окраске колоса, длине остей и другим признакам, что дало основания считать их соматоклональными вариантами.

Таким образом, практические аспекты использования метода эмбриокультуры заключаются в следующем:

- возможности получения межвидовых и межродовых гибридов;
- сохранении важного для селекции материала путем культивирования *in vitro* изолированных семяпочек и потерявших всхожесть семян;
- сокращении длительного селекционного процесса путем ускорения *in vitro* прохождения жизненного цикла растения;
- получении из гибридной каллусной ткани соматоклональных вариантов.

Экспериментальная гаплоидия. Роль гаплоидных растений в генетических исследованиях очень велика. Применение их позволяет легче обнаружить рецессивные мутации, редкие рекомбинации, экспрессию введенного извне генетического материала. Гаплоидия может широко применяться при количественном генетическом анализе сельскохозяйственных растений. Такой анализ включает изучение взаимодействия генов и генетической изменчивости, определения групп сцепления, установления числа генов, действующих на количественные признаки, установление локализации полигенов.

Гаплоиды также широко используются в селекционном процессе. Одно из важнейших направлений их применения заключается в возможности получения из гаплоидных клеток путем их обработки колхицином полностью гомозиготных диплоидных растений. Такие изогенные линии на основе удвоенных гаплоидов можно создать в течение года, тогда как метод имбридинга требует более 4–6 лет.

Гомозиготность широко используется в селекционном процессе. Изогенные линии облегчают селекционеру оценку и отбор новых признаков и позволяют ускорить процесс создания нового сорта в 2–3 раза.

Использование гаплоидов в селекционной работе



Получение соматоклональных вариантов. Уже в первых цитогенетических исследованиях культивируемых клеток было обнаружено их удивительное кариотипическое разнообразие. Очень заманчивой оказалась задача попытаться вновь воссоздать из таких измененных клеток полноценное растение. Были все основания предвидеть появление у них большого количества новых признаков. С разработкой техники получения растений–регенерантов из каллусной ткани появилась возможность получать новые формы растений, отличающихся как по фенотипическим, так и по генетическим признакам от исходных растений. Полученные таким образом растения – регенеранты назвали соматоклональными вариантами.

Впервые соматоклональные варианты табака были получены в СССР Загорской, Шаминой в 1970 г. Однако общий интерес к возможности получения соматоклональных вариантов возник позже, после опубликования в **1984** г. статьи австралийских исследователей Larkin et al. Соматоклональную изменчивость стали рассматривать как источник генетического разнообразия в создании новых форм растений. Число работ, выполненных с разными видами растений, после этого очень возросло. В настоящее время получены соматоклональные варианты риса, пшеницы, кукурузы, люцерны, картофеля, льна, табака и других растений.

Действительно, гибридизация и экспериментальный мутагенез сегодня уже не в полной мере удовлетворяют потребности практической селекции. Например, многие интересующие селекционера гены такой важной сельскохозяйственной культуры как пшеница даже при высоких дозах мутагенного воздействия ЁмолчатЎн, иными словами, мы не можем в этих экспериментах обнаружить появления мутаций по многим генам.

Наиболее вероятно предположить, что мутации по этим генам если и возникают, то элиминируются на самых ранних этапах развития признака (или растения). Вычленением из организма и переносом клетки в искусственно созданные условия культуры практически полностью устраняется влияние тканевых, органных, организменных регуляторных

систем, обеспечивающих стабильность генома. Уже само по себе отключение всей этой иерархии регуляторных систем приводит к потрясающей цитогенетической вариабельности культивируемых клеток.

Не привнося в среду никаких мутагенов, а только лишь переведя клетки в состояние культуры, можно получить широкую генетическую изменчивость.

Соматональная вариабельность – это уникальное явление, и генетические изменения, присущие ему, сложны, комплексны и прошли адаптацию к разным условиям культивирования. Частота возникновения подобных изменений в популяции клеток превосходит на три порядка частоту спонтанных мутаций. Изучение соматональных вариантов показало, что от прототипа они отличаются не только моногенными качественными признаками, но и (что более важно практически) количественными полигенными признаками (интенсивность роста, продуктивность, толерантность к неблагоприятным факторам среды).

Частота возникновения соматональных вариантов зависит от генетической гетерогенности соматических клеток исходного экспланта, условий культивирования *in vitro*, прежде всего состава питательной среды и уровня концентрации солей и регуляторов роста растения, а также типа морфогенеза – соматического эмбриогенеза или органогенеза. При соматическом эмбриогенезе время прохождения цикла клетка – растение значительно короче, чем при органогенезе, поэтому степень сходства получаемого материала и исходного родительского генотипа может быть значительно выше.

Следует учитывать, что не все генетические вариации, наблюдаемые на клеточном уровне, могут пройти сито морфогенеза. Часть из них реализуется только на клеточном уровне, но не на уровне целого растения. Однако соматональная вариабельность является очень богатым источником генетического разнообразия для создания новых форм растений.

Клеточная селекция *in vitro*. Одна из наиболее сильных сторон культуры клеток растений в создании технологий для сельского хозяйства – это возможность на основе соматональных вариаций или индуцированных мутаций отбирать в жестких селективных условиях клетки, характеризующиеся искомыми признаками, т.е. осуществлять клеточную селекцию *in vitro*.

В настоящее время наиболее активно развиваются такие направления проведения клеточной селекции как отбор клеток устойчивых к гербицидам, засолению, экстремальным температурам, патогенам, клеток, характеризующихся повышенным синтезом незаменимых аминокислот и др.

Для проведения работ по клеточной селекции растений в условиях *in vitro* в качестве объектов исследования используются каллусные, суспензионные культуры или изолированные протопласты. Наряду с перечисленными объектами, в качестве исходного материала для селекции могут быть выступать культуры соматических или андрогенных эмбриоидов, а также культура изолированных зародышей. Например, путем

культивирования и селекции *in vitro* зародышей из семян ячменя получены растения с улучшенным содержанием белка.

При культивировании пыльников яровой пшеницы на питательных средах с повышенным содержанием солей хлорида натрия получены соматические эмбриониды, а в дальнейшем растения–регенеранты, проявившие повышенную солеустойчивость. Однако удобнее использовать клеточные суспензии или изолированные протопласты.

Преимущество этих объектов состоит в быстром росте культуры и равномерном действии селективного фактора на все клетки.

Для проведения клеточной селекции используют следующие приемы:

1.Прямая (позитивная) селекция – наиболее простой способ отбора мутантов, поскольку резистентные клетки могут быть отобраны в большом количестве по их способности расти в присутствии ингибитора, в то время как чувствительные клетки гибнут.

2.Непрямая (негативная) селекция, основанная на избирательной гибели неустойчивых делящихся клеток дикого типа и выживания метаболически неактивных клеток, но требующая дополнительной идентификации у них мутационных изменений.

3.Тотальная селекция, при которой индивидуально тестируются все клеточные клоны.

4.Визуальная селекция и неселективный отбор – способы, при которых вариантная линия может быть идентифицирована визуально или с помощью биохимических методов.

Прямая селекция является наиболее распространенным методом и используется для выделения клеток, устойчивых к гербицидам, антибиотикам, токсинам, тяжелым металлам, солям и другим антиметаболитам.

Получение устойчивых линий – процесс длительный. Он включает многочисленные циклы выращивания и пересадки клеток на среды, содержащие селективный фактор. Например, при отборе суспензионной культуры моркови, устойчивой к глифосату, клеточные суспензии последовательно пересеивались на среды, содержащие все возрастающие концентрации гербицида до тех пор, пока не была достигнута 52–кратная устойчивость.

Соматическая гибридизация. Это метод получения гибридных растений в результате слияния протопластов, изолированных из соматических клеток родительских форм. Поскольку для слияния протопластов не существует барьеров, то на уровне протопластов могут быть объединены несовместимые при половом размножении виды растений. Причем такую искусственную гибридизацию можно осуществлять между соматическими клетками, принадлежащими далеким в систематическом отношении организмам и даже между растительными и животными клетками.

Принципиальное отличие соматических гибридов, полученных методом слияния протопластов, от гибридов, полученных половым путем,

состоит в том, что при половом скрещивании цитоплазматические гены передаются в большинстве случаев только от материнского растения, а при соматической гибридизации – двуродительно. Т.е. слияние протопластов способствует объединению двух различных цитоплазм, и в образовавшемся гибриде оба партнера имеют более или менее равный цитоплазматический статус.

При слиянии двух протопластов истинная гибридная клетка образуется, если сливаются ядра. Клетка, в которой слияние ядер не произошло, называется гетерокарионом. Гибрид, несущий гены ядра только от одного родителя наряду с цитоплазматическими (внеядерными) генами от обоих либо одного из родителей, называется *цитоплазматическим (цибридом)*.

Значение соматической гибридизации заключается в том, что она позволяет обойти проблему половой несовместимости у растений, облегчает перенос между разными видами внеядерных генетических элементов (митохондриальных и хлоропластных ДНК), а также обеспечивает возможность получения необычных сочетаний ядерных и цитоплазматических генов.

Соматическая гибридизация включает 4 этапа:

- выделение протопластов;
- их слияние;
- отбор и регенерацию гибридов;
- анализ растений–регенерантов.

Изолированные протопласты за то короткое время, за которое они не образовали клеточной стенки, могут сливаться между собой. Слияние может быть спонтанным (особенно в случае использования протопластов, изолированных из молодых тканей или суспензионных культур). Эффективность слияния повышается под действием различных индукторов. Для индукции слияния протопластов используют химический и электрический методы.

Химический метод заключается в добавлении к суспензии протопластов веществ, стимулирующих слияние. Исторически первым химическим индуктором, использованным для слияния протопластов, был NaNO_3 . В настоящее время наиболее часто используют метод, включающий в качестве индуктора ПЭГ, а также среды с высоким уровнем рН и высокой концентрацией Ca^{2+} . Химическим индуктором слияния протопластов также является поливиниловый спирт.

Преимущества химического способа индукции слияния протопластов заключаются в простоте исполнения. При этом могут сливаться протопласты, различающиеся по форме и размерам. Однако метод имеет и свои недостатки, которые заключаются в том, что в результате обработки индукторами часть протопластов повреждается и погибает.

Кроме того, зачастую сливаются не два, а большее количество протопластов, образуя нежизнеспособные гибриды.

В начале 80-х годов был разработан метод электрослияния

протопластов, привлекая внимание довольно высокой частотой слияния. Принцип метода заключается в том, что в специальную камеру, в которой создается неоднородное электрическое поле, помещают протопласты. В камеру вводят электроды и в этих условиях протопласты выстраиваются в цепочку между ними. Для слияния используют сильный импульс постоянного тока 1,2 кВ/см в течение 50 мкс.

Преимущества данного метода заключаются в его высокой эффективности, скорости, возможности регуляции процесса слияния.

Так, в последнее время был разработан его вариант, позволяющий сливать предварительно отобранные пары протопластов. Однако следует отметить, что метод электрослияния требует дорогостоящего оборудования.

Слияние – это случайный процесс. Обычно в слияние вовлекаются от 3 до 30 % протопластов. При использовании химических индукторов и обычного варианта метода электрослияния протопластов возможна агрегация и слияние протопластов как разных видов, так и одного и того же вида, т.е. происходит образование как гетерокарионов, так и гомокарионов. В связи с этим важным этапом получения соматических гибридов является отбор продуктов гетероплазматического слияния от протопластов родительских форм, а также продуктов слияния протопластов одного и того же вида.

Селекция гибридов может применяться либо на клеточном уровне, либо на стадии регенерации и осуществляется несколькими способами:

1. **Физиологическая комплементация.** Применяется в том случае, когда гибридные протопласты и исходные родительские формы различаются по составу оптимальной для их роста питательной среды. Данный способ отбора был использован при получении межвидовых гибридов, полученные при скрещивании *Nicotiana glauca* и *Nicotiana langsdorfii*.

2. **Генетическая комплементация** представляет собой такое взаимодействие генов в гибридной клетке, вследствие которого восстанавливаются функции дефектных генов. Для проведения отбора с помощью данного метода часто используют хлорофиллдефектность. Сочетание двух ядерных рецессивных мутаций у табака вызывает светозависимую хлорофильную недостаточность. Растения, гомозиготные по любому из этих генов, выращиваемые при интенсивном освещении, обесцвечиваются и гибнут. Для осуществления отбора гибридов после слияния протопластов клеточные колонии пересаживали на среду, индуцирующую органоогенез, и культивировали на свету.

3. **Отбор по морфологическим признакам.** Проводится в том случае, когда продукты слияния хорошо отличаются визуально. В качестве маркеров при идентификации гетероплазматического продукта достаточно часто используют пластиды. Например, при межродовом слиянии протопластов табака и моркови для отбора гибридов служили зеленые хлоропласты табака и красные хромопласты моркови.

4. **Использование прижизненных красителей** дает возможность отбора протопластов, полученных от слияния протопластов партнеров,

имеющих разную флуоресценцию – или нативную, или возникшую при окраске флуорохромами. Важное достоинство данного метода заключается в возможности автоматизации процесса благодаря использованию проточного флуориметра.

Существуют и другие способы отбора.

После слияния протопластов и отбора гибридных клеток в них возможны нежелательные генетические изменения (полиплоидизация, хромосомные абберации, различные точковые мутации). Эти изменения могут привести при морфогенезе к возникновению форм растений, которые представляют собой лишь фенкопии соматических гибридов.

Чтобы исключить возможность таких ошибок гибридные формы подвергают анализу для изучения их генетической природы. Анализ растений–регенерантов, полученных в результате соматической гибридизации, осуществляется по таким признакам как число хромосом и кариотип, изоэнзимный состав, состав полипептидов малой субъединицы рибулозо–1,5–дифосфаткарбоксилазы, митохондриальные и хлоропластные ДНК.

Помимо соматической гибридизации существует еще один близкий по своей сути способ получения растений с новыми полезными признаками – это **цибридизация**. Цибридизация представляет собой способ введения важных цитоплазматических генов. При этом цибридные растения содержат цитоплазму обоих партнеров, ядро – одного.

Разработаны следующие способы получения цибридов:

- слияние изолированного протопласта с цитопластом;
- слияние протопласта реципиента с протопластом, ядро которого инактивировано облучением и не способно к делению;
- микроинъекция;
- перенос с помощью липосом.

Благодаря цибридизации был осуществлен перенос генов, несущих признаки устойчивости к гербицидам, а также цитоплазматической мужской стерильности.

Использование метода культуры клеток, тканей и органов растений для сохранения генофонда

Существует несколько способов сохранения генофонда высших растений: заповедники, национальные парки, банки семян. Наиболее простым среди них является хранение семян. Однако данный метод неприменим к тем видам растений, чьи семена не выдерживают длительного хранения. В частности, к ним относятся древесные растения, сохранение генофонда которых осуществляется в виде искусственных посадок, что требует значительных площадей и регулярного ухода. У некоторых видов растений рекомбинации, возникающие при развитии семян, могут привести к разрушению ценных комплексов генов, накопленных в течение длительного времени. В связи с этим возникает необходимость в длительном хранении живой ткани в вегетативной форме.

В настоящее время один из наиболее перспективных способов

сохранения генофонда высших растений представляет собой *культивирование in vitro клеток, тканей и органов растений*. Для сохранения генофонда могут быть использованы:

- протопласты;
- суспензионные культуры клеток;
- каллусные культуры;
- пыльца и пыльники;
- культуры меристем побегов;
- зародыши;
- асептически выращиваемые целые растения.

В течение многих лет для поддержания исходных культур использовалось постоянное их выращивание при оптимальных условиях.

Например, в Отделе биологии клетки и биотехнологии института физиологии растений РАН в виде растущих коллекций поддерживаются 182 вида растений, из них в виде каллусов и суспензии – 85, растения в пробирках – 97. Наиболее длительно сохраняемыми являются культуры раувольфии змеевидной и женьшеня настоящего, которые хранятся уже в течение 40 лет.

При работе с растущими коллекциями необходимо стабильно поддерживать условия выращивания (температуру, влажность, освещенность), состав питательной среды также не должен меняться.

Периодическое субкультивирование трудоемко и значительно удорожает содержание коллекции. При субкультивировании возможны генетические изменения коллекционных объектов, а также снижение их способности к регенерации. Поэтому сейчас достаточно интенсивно разрабатываются различные способы депонирования коллекций, т.е. приемы, позволяющие изменить кинетику роста культуры увеличить время между пересадками.

Депонирование коллекций – сохранение коллекций без частых пересадок. Существует несколько способов лимитирования ростовых процессов. Среди них наиболее доступным и широко распространенным приемом является снижение температуры, при которой происходит культивирование. Выбор температуры определяется холодостойкостью вида растения. Так, для депонирования коллекции картофеля использовалась температура 9–10 °С, а как яблони 1 °С. Для культур обычно растущих при 20–25 °С рекомендуют использовать температуры 4–10 °С, а для культур, нормально растущих при температуре около 30 °С, – плюс 15–20 °С.

Другой прием заключается в *добавлении к среде для культивирования соединений, способных замедлять рост растений*. В качестве таких регуляторов могут выступать вещества, оказывающие осмотическое действие на клетки (маннит, сорбит, сахароза в повышенных концентрациях) или вещества гормональной природы (абсцизовая кислота, гидразид малеиновой кислоты, диметилгидразид янтарной кислоты, хлорхолинхлорид).

В редких случаях для депонирования коллекций используют снижение содержания кислорода – *гипоксию*. Например, условия гипоксии создают,

применяя смесь 90 % азота и 10 % кислорода. Иногда уменьшают концентрацию кислорода и одновременно снижают атмосферное давление (до 0,5 мм рт.ст).

Обычно время хранения культур с ограниченным ростом составляет *около года*. Возможности лимитирования роста имеют свои пределы.

Снижение скорости роста ниже некоторой точки приводит к гибели культуры. Для того, чтобы полностью отказаться от пересаживания культуры, необходимо использовать такой способ хранения, при котором происходит полная остановка метаболизма. В микробиологии для этих целей используют липофильную сушку. Но данный способ не приемлем для культур тканей высших растений. Современные знания не позволяют перевести культуры в состояние покоя, наблюдаемое в обычных семенах.

Единственным способом полного прекращения роста тканей высших растений является **криосохранение**, т.е. хранение при температуре жидкого азота или других достаточно низких температурах. Лишь при столь низких температурах гарантируется не только полное прекращение метаболических процессов, но и полная сохранность образца и всех его основных свойств. Сверхнизкие температуры обеспечивают длительное (десятки и сотни тысяч лет) хранение биологических объектов, т.е. организацию криобанков, из которых исследователь в любое удобное время может получить необходимый материал: семена, пыльцу, меристемы, эмбриониды и клетки. Нельзя не отметить то, что криобанки позволяют значительно экономить затраты по сравнению с депонированием, не говоря уже о постоянно растущих коллекциях.

В РАН криобанк был впервые организован в 1976 г. Для начала в качестве модельного объекта была использована морковь в виде молодой суспензии клеток. Был разработан метод замораживания специально по отношению к данному объекту, после чего клетки сохранялись в жидком азоте при температуре $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Криосохранение обеспечивало стабильность всех генетических характеристик культуры, в том числе и способности к регенерации целых растений после оттаивания. Этот успех дал возможность широко развернуть работы по сохранению различных растительных объектов в криобанках.

Трудности криосохранения растений связаны со спецификой растительных клеток. Растительные клетки имеют большие размеры, большие вакуоли и много воды. Образование льда и дегидратация являются основными факторами, способными привести клетку к гибели при замораживании. Обычно кристаллы льда вначале образуются в межклеточном пространстве, а затем внутри клетки. Их рост оказывает механическое воздействие на клетки, разрушая клеточные мембраны.

Кроме того, кристаллы льда играют водоотнимающую роль, что приводит к значительной дегидратации клетки и возможной ее гибели от *осмотического стресса*. Максимальная скорость роста кристаллов льда находится в пределах от $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. При температуре $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ рост кристаллов льда совершенно прекращается. Следовательно, и при

замораживании и при оттаивании клеткам важно с оптимальной скоростью «проскочить» температуру образования льда.

Кристаллизация льда затрудняется в присутствии криопротекторов. К криопротекторам относится гетерогенная группа соединений, которые действуют различными механизмами на повышение выживаемости клеток при замораживании. Наиболее известны такие криопротекторы, как ДМСО, различные сахара, глицерин, этиленгликоль и их производные. Действие криопротекторов состоит в снижении точки замерзания воды. Они способны связывать внутриклеточную воду, повышать вязкость раствора, защищая таким образом клетку от механического и осмотического стресса. Их можно разделить на две группы: **проникающие** (ДМСО) и **непроникающие** (поливинилпирролидон, декстран, полиэтиленгликоль). 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°C.

Помимо состава и количества природных и искусственно добавляемых криопротекторов выживаемость клеток растений при криосохранении зависит от таких факторов как их способность к холодовому закаливанию, скорости снижения температуры и условий оттаивания.

Работа по криосохранению культуры клеток состоит из следующих этапов:

- подготовки культуры клеток;
- добавления криопротектора;
- замораживания;
- хранения в жидком азоте;
- оттаивания;
- удаления криопротектора;
- рекультивирования и регенерации растений (рис. 64).

Для криосохранения разных объектов требуются различные подходы и условия, начиная с самого начального этапа работы. Лучше всего методы криосохранения разработаны для суспензионных культур.

Перед применением процедуры криосохранения необходимо осуществить выбор наиболее подходящей фазы развития культуры. Как уже отмечалось, одним из наиболее критических факторов, влияющих на выживаемость клеток в процессе замораживания до – 96°C, является степень их вакуолизации. Крупные вакуолизированные клетки погибают гораздо чаще, чем мелкие меристематические. Поэтому на этапе подготовки культуры к замораживанию ее культивируют в условиях, способствующих образованию мелких клеток и синхронизации их деления. Для отдельных культур положительное влияние на жизнеспособность клеток оказывает предварительное культивирование с некоторыми аминокислотами, благодаря увеличению уровня эндогенных сахаров в клетках. Для суспензионных культур важным моментом подготовки является концентрирование. Так, на клетках моркови показано, что увеличение плотности культуры в 2– раза

значительно повышает выживаемость клеток.

На следующем этапе осуществляется предварительное культивирование клеток с криопротектором. Подбор криопротектора проводят эмпирически по принципу наименьшей токсичности и оптимального эффекта. На практике используют как отдельные криопротекторы, так и их смеси, в которых токсичность одного из веществ снижается за счет присутствия другого. Обычно их вносят в среду для культивирования, которую затем доводят до стандартного рН и стерилизуют перед добавлением к культуре.

При использовании криопротекторов возникают определенные трудности, связанные с их добавлением и удалением. За исключением крайне быстро проникающих соединений, таких как метанол, ДМСО, добавление криопротекторов первоначально вызывает сжатие клеток.

Затем по мере проникновения криопротектора клетка постепенно приобретает свою первоначальную форму. При удалении криопротектора процесс протекает в обратном направлении, и клетка, возвращаясь в изотонические условия, сначала разбухает, а затем постепенно восстанавливает свои нормальные размеры. Если концентрация добавки, требуемой для криосохранения, высока, то такие изменения объема могут повредить клетку.

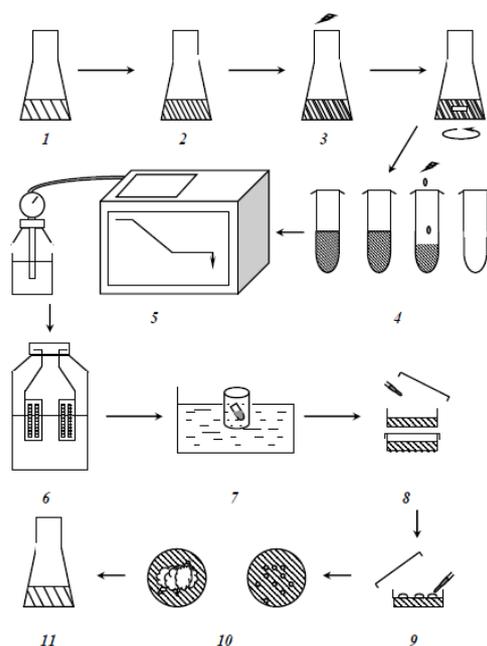


Рисунок 71. - Схема криосохранения культуры растительных клеток: 1 –подготовка культуры; 2 –концентрирование культуры; 3 –добавление криопротектора; 4 –перенос в ампулы; 5 –программированное замораживание; 6 – помещение в жидкий азот; 7 –оттаивание; 8 –перенос на чашки Петри; 9 –удаление криопротектора; 10 –возобновление роста; 11 –рекультивирование.

Поэтому рекомендуют добавлять криопротектор в постепенно возрастающей концентрации, и удалять его в постепенно убывающей концентрации. Стресс при разбавлении обычно оказывает на клетку более разрушающее воздействие.

Наряду с выбором криопротекторов очень важно найти *оптимальную программу замораживания*. В настоящее время известны два способа криосохранения: программное (медленное) и сверхбыстрое замораживание. При медленном постепенном замораживании температура в интервале от 0 до -0°C снижается со скоростью $0,5-1^{\circ}\text{C}$ в минуту. При быстром замораживании объект в ампуле с криопротектором погружается сразу в жидкий азот. Программное замораживание изучалось уже давно, поэтому оно довольно широко применяется для сохранения растительных и животных объектов. Для этого требуются специальные конструкции с рабочей камерой, охлаждаемой с запрограммированной скоростью введение паров жидкого азота. Разработка сверхбыстрого замораживания началась сравнительно недавно, однако считается, что именно этот метод со временем станет наиболее перспективным.

Хранение материала в жидком азоте практически не лимитировано.

Последним этапом технологии криосохранения является оттаивание и проверка жизнеспособности клеток после хранения в жидком азоте. Этой фазе, как и фазе подготовки культуры до недавнего времени не придавалось серьезного значения, однако конечный результат во многом зависит от них.

Если замораживание осуществляют медленно, постепенно, то оттаивание должно быть проведено как можно быстрее. При слишком медленном оттаивании клеток в них происходит повторное образование льда, оказывающее повреждающее действие. Оттаивание производят погружая ампулы в водяную баню с температурой 40°C , а иногда и 60°C и выдерживают до полного исчезновения последнего кристаллика льда.

Очень редко оттаивание образцов проводят на воздухе при комнатной температуре.

Для поддержания жизнеспособности легко ранимых после оттаивания образцов и возобновления их роста требуется тщательный уход. Не всегда условия, используемые для культивирования перед замораживанием, пригодны для культивирования после оттаивания.

Культуры пересаживаются на восстанавливающую среду без промывки с сохранением в клетках криопротекторов. Зачастую криопротектор удаляется специальными условиями промывки. Для определения жизнеспособности клеток, тканей, органов и организмов после низкотемпературного хранения существует много специальных методов.

Технология, связанная с криосохранением растительных объектов все время развивается и постоянно совершенствуется. Несомненно, эта технология имеет будущее, т.к. уже сегодня криобанки могут значительно облегчить работу селекционеров, предоставив им возможность широко использовать пул генов сортов, в том числе старой селекции и диких видов, а также исчезающих растений.

16. ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ЭНЗИМЫ

В последние 15–20 лет на стыке ряда химических и биологических дисциплин сложилось новое «инженерное» направление – химическая энзимология, стремительное развитие которой было обусловлено созданием биологических катализаторов нового типа – **иммобилизованных ферментов**. А разработка метода иммобилизованных ферментов определялась, в свою очередь, рядом существенных факторов, затрудняющих использование чистых ферментов во многих промышленных производствах.

Во-первых, чистые препараты ферментов неустойчивы при длительном хранении, а также при разного рода воздействиях, особенно тепловых.

Во-вторых, в виду сложности отделения ферментов от различных реагентов смеси многократное их использование весьма затруднено.

Однако принципиально новые перспективы открылись перед прикладной энзимологией с разработкой принципов создания иммобилизованных ферментов.

Иммобилизация – это ограничение конформационной подвижности молекулы энзима при сохранении (частичном или полном) каталитической активности для многократного использования энзима или увеличения продолжительности его действия.

Иммобилизованные ферментные препараты обладают рядом существенных преимуществ при использовании в прикладных (промышленных целях) производствах по сравнению с чистыми препаратами. Гетерогенный (иммобилизованный) катализатор легко отделить от реакционной среды, что обуславливает:

- возможность остановки реакции в любой нужный момент;
- повторное использование катализатора;
- получение конечного продукта, не загрязненного ферментом.

Последний момент весьма важен при производстве пищевых и медицинских продуктов.

– *Применение иммобилизованного катализатора* позволяет проводить ферментный процесс непрерывно и регулировать скорость реакции, а также изменять количество получаемого продукта в соответствии с изменениями скорости потока реакционной смеси.

– *Иммобилизация или некоторая модификация фермента* может обусловить изменения и некоторых его свойств (специфичность взаимодействия с субстратом; зависимость каталитической активности от pH, ионного состава и других параметров среды, а также его стабильность по отношению к различного рода денатурирующим воздействиям).

– *Иммобилизация ферментов* дает возможность регулировать их каталитическую активность за счет изменения свойств носителя.

Первым иммобилизованным энзимом, примененным в промышленном масштабе, была **аминоацилаза**. Она была использована в Японии в **1969** г. для производства аминокислот, добавляемых в корм животных. На мировом рынке эта продукция пользуется большим спросом.

Первый промышленный процесс с использованием иммобилизованных энзимов (1969 г., компания «Танабе Сейяку», Япония) – разделение рацемических смесей аминокислот на изомеры с помощью аминоксилазы, иммобилизованной на ДЭАЭ-целлюлозе.

Механизм разделения в том, что используя в качестве исходного вещества ацилированные L- и D-аминокислоты, полученные органическим синтезом, применяют аминоксилазу, гидролизующую лишь ацил-L-изомер, отщепляя ацильную группу и резко увеличивая растворимость образующейся L-аминокислоты в отличие от ацил-D-изомера. После этого вещества легко отделяются друг от друга и получают чистую L-аминокислоту. Остающаяся ацил-D-аминокислота переходит в исходную смесь ацил-L- и D-аминокислот, и процесс повторяют снова.

Энзим иммобилизуют путем ионного связывания на колонке с носителем. После непрерывной автоматизированной работы в течение 30 дней при 50 °С активность ацилазы снижается до 40%; для восстановления активности добавляют свежий энзим. В результате благодаря иммобилизации экономится 40% ацилазы. Использование аминоксилазы для получения оптических изомеров аминокислот позволило наладить поточный выпуск аминокислот в качестве кормовых добавок и сократить затраты на их производство для других отраслей промышленности.

Колонки с аминоксилазой используются в Японии для производства сотен килограммов L-метионина, L-фенилаланина, L-триптофана и L-валина.

Ферментно-полимерные конъюгаты широко используются в аналитической и клинической химии.

Возможности и достоинства гидролаз были продемонстрированы при модификации самых эффективных и широко применяемых антибиотиков – пенициллинов и цефалоспоринов. Получение новых, более эффективных аналогов пенициллина связано с изменением его боковой цепи при сохранении целостности остальной части, «ядра» антибиотика -6-аминопенициллановой кислоты. В настоящее время большое значение имеет так называемый полусинтетический (биологический + химический) способ получения аналогов природного пенициллина, обладающих рядом ценных свойств. Исходным продуктом в синтезе служит 6-аминопенициллановая кислота (6-АПК). Бензилпенициллин является исходным сырьем для получения (6АПК), но в его молекуле присутствует чрезвычайно лабильное бета-лактамное кольцо и проведение химического деацилирования бензилпенициллина – трудная задача. Ацилированием аминогруппы 6-АПК получен ряд новых полусинтетических антибиотиков, которые кислотоустойчивы в желудке, не подвергаются деструкции в организме пенициллиназой, обладают более широким спектром действия. Поэтому в промышленности использовали для обработки бензилпенициллина бактериальную массу *E. coli*, содержащую пенициллинамидазу. Энзим расщеплял именно ту амидную связь, которая необходима для образования 6-АПК. В результате применения иммобилизованных бактериальных клеток, содержащих пенициллинамидазу, а затем и самой иммобилизованной

пенициллинамидазы, удалось значительно повысить продуктивность и экономичность промышленного получения 6-АПК. В Европе в год производится примерно 3500 т этой кислоты, а для этого требуется произвести около 30 т указанного фермента.

Американская компания «Клинтон Корн», которая в 1973 году внедрила в промышленность процесс получения фруктозы из глюкозы с помощью иммобилизованной глюкозоизомеразы. В настоящее время эта компания производит иммобилизованную глюкозоизомеразу разных типов и предназначенную для использования в реакторах различной конфигурации.

Иммобилизованная глюкозоизомераза может иметь вид волокон, гранул или аморфной массы. Для волокнистых форм характерна большая удельная поверхность и соответственно высокая удельная активность энзима. Поэтому в отличие от гранулированных форм их обычно применяют в виде слоев относительно небольшой толщины.

Глюкозоизомераза для промышленности, как правило, иммобилизуется на носителе нековалентно из-за дороговизны ковалентно иммобилизованных препаратов глюкозоизомеразы. Энзим адсорбируют на ионообменных смолах или пористых неорганических носителях. Используются и иммобилизованные микробные клетки – продуценты глюкозоизомеразы. Благодаря этому повышается стабильность энзима.

Производительность промышленных реакторов от 1–9 тонн глюкозо-фруктозного сиропа на 1 кг иммобилизованной глюкозоизомеразы. Проточные реакторы колонного типа, как правило, имеют более высокую эффективность, чем реакторы перемешивания. В реакторах колонного типа расход энзима обычно в 1,4–4 раза ниже, а время контакта энзима с субстратом в этих реакторах в среднем не превышает 4 часов, а в реакторах перемешивания на контакт энзима с субстратом уходит 20–40 часов. В смеси, поступающей в реактор, должно быть достаточно высокое содержание глюкозы (93–96%). Присутствие более 10% олигосахаридов в смеси в значительной степени снижает активность иммобилизованного энзима. Время контакта энзима с субстратом варьирует в диапазоне 0,5–4 часов. Такой большой временной интервал объясняется постепенной инактивацией энзима. Время полуинактивации глюкозоизомеразы, как правило, колеблется в диапазоне 20–70 суток.

Миллионы тонн такого сиропа ежегодно выпускаются с помощью этого фермента, который в настоящее время является наиболее широко применяемым из всех иммобилизованных ферментов.

Промышленные и коммерческие успехи этого процесса определяются следующими факторами: глюкоза, получаемая из крахмала, относительно дешевая; фруктоза – более сладкая, чем глюкоза; концентрированный фруктозный сироп содержит примерно одинаковые количества глюкозы и фруктозы, а по сладости подобен сахарозе.

В настоящее время с использованием иммобилизованных энзимов и клеток ведутся следующие промышленные процессы:

- получение глюкозо-фруктозных сиропов;

- получение оптически активных L-аминокислот из их рацемических смесей;
- синтез L-аспарагиновой кислоты (подсластитель и подкислитель) из фумарата аммония;
- синтез L-аланина из L-аспарагиновой кислоты;
- синтез L-яблочной кислоты из фумаровой кислоты;
- получение безлактозного молока;
- получение сахаров из молочной сыворотки;
- получение 6-аминопенициллановой кислоты.

Иммобилизованные на колонках ферменты могут использоваться повторно в качестве специфических катализаторов при определении различных субстратов. Например, разработаны ферментные электроды для потенциометрических и амперометрических определений таких веществ, как мочевины, аминокислоты, глюкоза, спирт и молочная кислота.

Электрод представляет собой электрохимический сенсор, находящийся в тесном контакте с тонкой проницаемой ферментной мембраной, способной специфически реагировать с какими-либо конкретными субстратами. Включенные в мембрану ферменты продуцируют кислород, ионы водорода, ионы аммония, двуокись углерода или другие небольшие молекулы (в зависимости от осуществляемой реакции), которые затем легко детектируются специфическим сенсором. Выраженность ответа указывает на концентрацию определяемого вещества.

Применение ферментной технологии в существующих в настоящее время процессах (таких, как пивоварение, обработка пищевых продуктов, фармакология, химическая промышленность и т. п.) имеет огромные перспективы, однако до полной реализации ее еще весьма далеко.

Если говорить о будущем, то кажется вполне обоснованным ожидать, что производство и применение ферментов будут постоянно расширяться.

Аргументацией этому является растущая в мире обеспокоенность в отношении загрязнения окружающей среды, истощения ряда ресурсов, в частности энергетических (рост цен на нефть и другие виды сырья). Все это стимулирует развитие новых направлений исследований, и практически не возникает сомнений, что ферменты в решении указанных проблем будут играть важную роль.

Кроме иммобилизованных энзимов используют также иммобилизованные клетки. При использовании их отпадает необходимость выделения и очистки энзимных препаратов, применения коэнзимов, создается возможность получения полиэнзимных систем.

Иммобилизация представляет собой включение фермента в такую среду, в которой для него доступной оказывается лишь ограниченная часть общего объема. На практике для иммобилизации ферментов используют рутинные физические и химические методы.

Основные приемы иммобилизации:

- физическая (физико-химическая);
- химическая (ковалентная).

«Физическая» иммобилизация энзимов представляет собой включение энзима в такую среду, в которой для него доступной является лишь ограниченная часть общего объема.

При физической иммобилизации энзим не связан с носителем ковалентными связями.

Существует четыре типа «физической» иммобилизации энзимов:

- адсорбция на нерастворимых носителях;
- включение в поры геля;
- пространственное отделение энзима от остального объема реакционной системы с помощью полупроницаемой перегородки (мембраны);
- включение в двухфазную среду, где энзим растворим и может находиться только в одной из фаз.

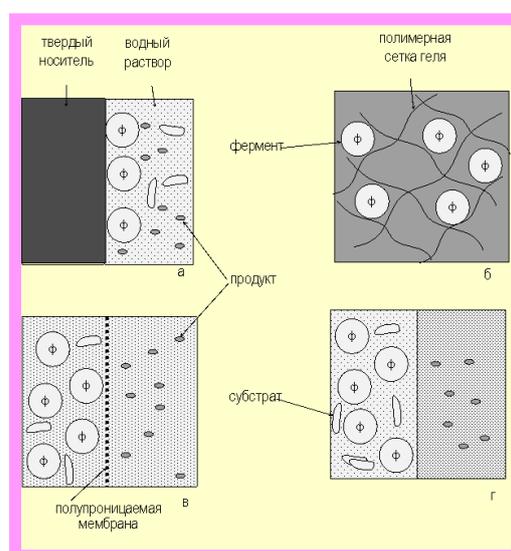


Рисунок 72. – Физическая иммобилизация энзимов

Как и всякая другая классификация, приведенная ниже, является в значительной степени условной, так как не всегда существует возможность проведения четкой границы между различными способами иммобилизации.

Адсорбционная иммобилизация является наиболее старым из всех существующих в настоящее время способов иммобилизации ферментов.

Носителями при данном способе иммобилизации могут быть как органические, так и неорганические вещества, которые применяются в виде порошка, мелких гранул или шариков. Иммобилизация ферментов путем адсорбции на нерастворимых носителях отличается исключительной простотой и достигается путем обеспечения контакта водного раствора фермента с избранным для конкретной цели носителем.

После отмывки неадсорбированного фермента препарат готов к применению.

На процесс адсорбции и прочность связывания фермента с носителем оказывают определенное влияние различные факторы внешней среды, основными из которых являются: удельная поверхность и пористость

носителя, значения рН среды, ионная сила раствора фермента, его концентрация, а также температура проведения адсорбции. Иными словами, эффективность иммобилизации ферментов определяется сбалансированностью ряда факторов и нарушение этого баланса может привести к резкому ослаблению взаимодействия фермента с носителем.

Для исключения подобной ситуации, на практике используется набор методических приемов, способствующих повышению эффективности процесса и, следовательно, получению более качественных препаратов.

Иммобилизация путем включения в гели состоит в том, что молекулы фермента включаются в трехмерную сетку, образованную тесно переплетающимися нитями (цепями), формирующими гель. Пространство между полимерными цепями в геле заполнено водой, на долю которой приходится обычно значительная часть общего объема геля. Для иммобилизации фермента в геле существует два основных способа:

– при одном из них фермент вводится в водный раствор мономера, а затем уже проводят полимеризацию, в результате которой формируется гель с включенными в него молекулами фермента,

– второй способ состоит в том, что фермент вносится в раствор уже готового полимера, который затем каким-либо образом переводят в требуемое состояние, гелеобразное состояние.

Иммобилизация путем включения в полупроницаемые мембраны – состоит в том, что водный раствор фермента отделяется от водного раствора субстрата полупроницаемой мембраной, способной легко пропускать небольшие молекулы субстрата, задерживая крупные молекулы фермента. Существующие модификации этого метода различаются лишь способами получения полупроницаемых мембран и их природой.

К этим модификациям относятся:

– **микрокапсулирование** в замкнутых сферических пузырьках, имеющих тонкую полимерную стенку (мембрану).

– **метод двойного эмульгирования**, в соответствии с которым приготовленная заранее эмульсия водного раствора фермента в органическом растворе полимера вновь диспергируется в воде. После затвердевания органического раствора образуются полимерные сферические частицы с иммобилизованными в них молекулами фермента.

Способ включения в волокна отличается от метода микрокапсулирования главным образом формой получаемых препаратов.

Если при микрокапсулировании образуются сферические микрокапсулы, то при этом способе формируются нити. Для иммобилизации ферментов можно использовать также выпускаемые промышленностью полимерные полые волокна, изготавливаемые из природных или синтетических материалов. Для проведения ферментативной реакции волокна, по которым циркулирует раствор фермента, погружаются в сосуд с раствором субстрата, диффундирующим через мембрану внутрь волокна.

В медицинских целях и некоторых фундаментальных исследованиях достаточно широко используется **метод иммобилизации ферментов путем**

их включения в липосомы, поскольку такие системы близки природным мембранам и могут дать весьма ценную информацию о ферментативных процессах, протекающих в клетках. Существует несколько модификаций данного способа, самой последней из которых является иммобилизация путем включения в полимерные липосомы. Полимерные липосомы характеризуются более высокой стабильностью по сравнению с обычными.

Основным недостатком всех мембранных систем, применяемых для иммобилизации ферментов, является невозможность ферментативного превращения высокомолекулярных субстратов, для которых мембраны представляют собой непреодолимые барьеры.

*Литература***Основная литература**

1. Евтушенков, А.Н. Введение в биотехнологию [Электронный ресурс] : курс лекций / А. Н. Евтушенков, Ю. К. Фомичев. - Минск : БГУ , 2004 эл. опт. диск (CD-ROM).
2. Биотехнология. Практикум по культивированию клеточных культур : учебное пособие / М. Ш. Азаев [и др.]. - М. : ИНФРА-М, 2020. – 142 с.
3. Биотехнология: В 8 кн. / под ред. Н.С. Егорова и В. Д. Самуилова. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.studmed.ru/egorov-ns-red-biotehnologiya-kniga-1-problemy-i-perspektivy_ac350a29638.html#
4. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. М.: Мир, – 2002.
5. Гончаренко, Г.Г. Основы генетической инженерии / Г.Г. Гончаренко. - Мн.: Вышэйшая школа, 2005.
6. Егорова, Т.А. Основы биотехнологии : учебное пособие / Т. А. Егорова, С. М. Клунова, Е. А. Живухина. - 4-е изд. - М. : Академия, 2008. – 208 с.
7. Желдакова, Р. А. Основы биотехнологии: методические указания к лабораторным занятиям для студентов биологического факультета / Р. А. Желдакова, В. Е. Мямин, Е. И. Игнатенко, Ю. В. Селезнева. – Минск: БГУ, 2009. – 48 с.
8. Загоскина, Н. В. Биотехнология: теория и практика, учебное пособие для вузов / Н. В. Загоскина, Л. В. Назаренко, Е. А. Калашникова, Е. А. Живухина. – М.: Изд. Оникс, 2009. – 496 с.

Дополнительная литература

9. Албертс, Б. Молекулярная биология клетки / Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж и др. М.: Мир, 1994. Т.1-3.
10. Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.nehudlit.ru/books/detail1184912.html>
11. Воробьева, Л. И. Промышленная микробиология : учебное пособие. – М.: Изд-во МГУ, – 2000.
12. Ермишин, А. П. Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика / А. П. Ермишин – Мн.: Тэхналогія, – 2005.
13. Ксенофонтов, Б.С. Основы микробиологии и экологической биотехнологии: учебное пособие: допущено Учебно-методическим

объединением вузов по университетскому политехническому образованию в качестве учебного пособия для студентов высших учебных заведений, обучающихся по направлению 280700 "Техносферная безопасность" (квалификация/степень - бакалавр) / Б. С. Ксенофонов. - М. : ИД ФОРУМ ; [Б. м.] : ИНФРА-М, 2017. – 224 с.

14. Основы биотехнологии : методические указания к лабораторным работам для студентов биологического факультета специальностей 1-31 01 01 "Биология (по направлениям)" и 1-33 01 01 "Биоэкология" / Р. А. Желдакова [и др.]. - Минск : БГУ , 2009. - 48 с.

15. Промышленная микробиология: учебное пособие для вузов / З. А. Аркадьева [и др]; под ред. Н.С. Егорова. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://booksonchemistry.com/index.php?author=arkadeva-za&book=1989&category=biochem&id1=3>

16. Сельскохозяйственная биотехнология: учебник / В. С. Шевелуха [и др.]; под ред. В. С. Шевелухи – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. шк., 2003. -467 с. Современная микробиология: прокариоты / под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. М.: Мир, 2005. – Т. 2.

17. Рыбчин, В. Н. Основы генетической инженерии. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.booksmed.com/biologiya/1300-osnovy-geneticheskoy-inzhenerii-rybchin.html>

18. Щелкунов, С. Н. Генетическая инженерия: учебно-справочное пособие. 2-е изд, испр. и доп. – Новосибирск: Сиб унив. изд-во, – 2004.

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

1 Место дисциплины в системе подготовки специалиста

Курс «Введение в биотехнологию» предусматривает определение термина «биотехнология», содержание дисциплины и места биотехнологии в системе наук на современном этапе развития общества, ее взаимодействие с другими дисциплинами биологического, химического, инженерного и экономического профиля. Предусмотрен также анализ достижений биотехнологии и предполагаемых перспектив ее дальнейшего развития.

Биотехнология – одна из наиболее динамично развивающихся биологических дисциплин современности. Возникнув как чисто практическое приложение знаний, накопленных в микробиологии, биохимии, генетике, молекулярной биологии и других дисциплинах, биотехнология постоянно стимулирует развитие биологических и химико-технологических дисциплин. Строго говоря, биотехнология является горизонтальной дисциплиной, использующей методологию других дисциплин – микробиологии, биохимии и генетики, а также ряда их разделов, получивших развитие в последние десятилетия.

В силу этого диапазон процессов, являющихся в настоящее время объектами изучения и приложения биотехнологии, чрезвычайно широк. Он включает молекулярный уровень (конструирование рекомбинантных молекул и белковую инженерию), клеточный уровень (биосинтез биологически активных соединений), уровень организменный (трансгенные организмы), экосистемы (очистка и детоксикация объектов окружающей среды, повышение эффективности экосистем). Это выделяет биотехнологию как интегральную биологическую дисциплину. Наибольший практический интерес представляют процессы получения биологически активных соединений, используя биотехнологические объекты.

Не следует забывать также и о другой стороне использования биотехнологии – разработке бактериологического и биологического оружия.

2 Цели и задачи учебной дисциплины

Цель курса – сформировать у студентов представление об основных направлениях развития современной биотехнологии, путях и средствах решаемых ею проблем.

В **задачи** учебной дисциплины входит получение студентами знаний об основных объектах биотехнологии: энзимы, клетки про- и эукариот, их характеристика и область применения; о модельных и базовых объектах биотехнологии, типах и режимах ферментационных процессов; основных направлениях биотехнологии (в пищевой, легкой, фармацевтической промышленности, медицине, сельском хозяйстве и т.д.).

3 Требования к уровню освоения учебной дисциплины

В результате изучения дисциплины студент должен закрепить и развить академические (АК), овладеть следующими профессиональными

(ПК) компетенциями, предусмотренные в образовательном стандарте 1-310101 Биология (по направлениям):

а) академическими:

АК-1: Уметь применять базовые научно-теоретические знания для решения теоретических и практических задач.

АК-2: Владеть системным и сравнительным анализом.

АК-3: Владеть навыками исследовательской работы.

АК-4: Уметь работать самостоятельно.

АК-6: Владеть междисциплинарным подходом при решении вопросов.

б) профессиональными:

студент должен:

научно-исследовательская деятельность

ПК-1: Освоить основы проведения экспериментов биотехнологического характера, анализа полученных результатов; формулировать из полученных результатов корректные выводы.

ПК-2: Осваивать новые модели, теории, методы исследования, участвовать в разработке новых методических подходов.

ПК-3: Осуществлять в научной литературе поиск и анализ данных по изучаемой проблеме, составлять аналитические обзоры.

ПК-4: Готовить материалы к презентациям, рефераты, доклады, а также овладевать спецификой подготовки научных статей.

ПК-5: Составлять и вести документацию по проводимым научным исследованиям.

научно-производственная деятельность

ПК-6: Квалифицированно проводить научно-производственные исследования, выбирать грамотные и экспериментально обоснованные методические подходы, давать рекомендации по практическому применению полученных результатов.

ПК-7: Осуществлять поиск и анализ данных по изучаемой проблеме в научно-технических и других информационных источниках.

ПК-8: Участвовать в работе по подготовке научных статей и заявок на изобретения.

ПК-9: Организовывать работу по обоснованию целесообразности научных проектов и исследований.

ПК-10: Составлять и вести документацию по научно-производственной деятельности.

производственная деятельность

ПК-11: Выполнять работы на современном производственном и лабораторном оборудовании, используя техническую документацию.

ПК-12: Подбирать соответствующее оборудование, аппаратуру, приборы и инструменты и использовать их при осуществлении производственной деятельности.

ПК-13: Учитывать основные принципы организации производств при выполнении профессиональной деятельности и обоснованно формулировать

рекомендации по совершенствованию технологического процесса.

ПК-17: Владеть информацией о производствах, основанных на использовании биологических объектов в Республике Беларусь, странах ближнего и дальнего зарубежья, и использовать ее в производственной деятельности.

Для приобретения профессиональных компетенций **ПК-1 – ПК-13, ПК-17** в результате изучения дисциплины студент должен:

знать:

- принципы подбора биологических объектов для биотехнологических производств и требования, предъявляемые к ним;
- основные технологические процессы с использованием микроорганизмов, культуры клеток в биотехнологии;
- типы и режимы ферментаций, составы питательных сред и основные параметры роста культур;
- основы молекулярной биотехнологии;
- основные схемы очистки биотехнологических продуктов;
- требования к производству продуктов медицинского назначения;
- достижения биотехнологии, особенности развития биотехнологических производств в Республике Беларусь в прошлые годы и на современном этапе.

уметь:

- работать с культурами микроорганизмов;
- выращивать культуры бактерий в колбах и ферментере;
- контролировать энзиматическую активность бактерий;
- проводить селекцию активных продуцентов.

4 Объем дисциплины и виды учебной работы

Дисциплина «Введение в биотехнологию» изучается студентами 2-го курса в дневной форме получения высшего образования специальности 1-31 01 01-03 Биология (биотехнология).

В дневной форме получения высшего образования для изучения дисциплины предусмотрено всего 136 академических часов, в том числе 52 часа аудиторных: 36 часов лекций, 16 часов лабораторных занятий. Форма текущей аттестации – экзамен (3 семестр).

Программа курса составлена с учетом межпредметных связей по смежным дисциплинам биологического профиля («Микробиология», «Генетика», «Биохимия», «Молекулярная биология» и др.) Программа построена по блочно-модульному типу, что предполагает выделение основных разделов курса.

СОДЕРЖАНИЕ УЧЕБНОГО МАТЕРИАЛА

1. Введение

Биотехнология как межотраслевая область научно-технического прогресса и раздел практических знаний. Этапы развития биотехнологии. Основные факторы, обусловившие развитие современной биотехнологии. Связи биотехнологии с биологическими, химическими, техническими и другими науками. Практические задачи биотехнологии и области применения достижения биотехнологии.

2. Объекты биотехнологии

Микроорганизмы (бактерии и высшие протисты) - основные объекты биотехнологии. Преимущества микроорганизмов перед другими объектами в решении современных биотехнологических задач. Принципы подбора биотехнологических объектов: модельные и базовые микроорганизмы, штаммы микроорганизмов, использующиеся в биотехнологии. Выделение и селекция микроорганизмов, продуцентов биологически активных веществ. Принципиальные подходы к улучшению штаммов промышленных микроорганизмов. Промышленные ферменты микробного происхождения.

Клетки животных и растений как объекты биотехнологии. Использование клеточных культур в биотехнологических процессах. Трансгенные животные и растения как новые объекты биотехнологии.

3. Сырьевая база биотехнологии

Требования, предъявляемые к питательным субстратам, используемым в биотехнологических процессах. Природные сырьевые материалы растительного происхождения. Отходы различных производств, как сырье для биотехнологических процессов. Химические и нефтехимические субстраты, применяемые в качестве сырья для биотехнологии. Три поколения питательных субстратов.

4. Технологии ферментационных процессов

Преимущества и недостатки биотехнологических производств по сравнению с химическими технологиями. Принципиальные схемы биотехнологических процессов, определяющие конструкции биореакторов (ферментаторов). Основные требования, предъявляемые к системам, используемым для процессов ферментации.

Типы и режимы ферментации: периодические и непрерывные процессы. Основные требования, предъявляемые к биореакторам. Системы перемешивания, применяемые в современных ферментаторах. Проблемы аэрирования, пеногашения, асептики и стерильности при различных

ферментациях. Открытые и замкнутые ферментационные системы. Хемостатные и турбидостатные системы культивирования продуцентов. Принципы масштабирования технологических процессов: лабораторные, пилотные и промышленные ферменторы и решаемые с их использованием задачи. Специализированные ферментационные технологии: анаэробные, твердофазные и газофазные процессы. Особенности культивирования клеток животных и растений.

Конечные стадии получения продуктов биотехнологических процессов. Отделение биомассы: флотация, фильтрование и центрифугирование. Методы дезинтеграции клеток: физические, химические и энзиматические. Выделение целевого продукта: осаждение, экстрагирование, адсорбция, электрохимические методы, хроматография. Концентрирование, обезвоживание, модификация и стабилизация целевых продуктов биотехнологических процессов.

5. Производство микробного белка

Биотехнология производства «одноклеточного» белка. Продуценты белка. Требования, предъявляемые к микробному белку и возможности его использования. Сырьевая база производства белка одноклеточных организмов; высокоэнергетические субстраты, отходы сельского хозяйства и других производств.

6. Ферментная технология

Область применения энзимов в биотехнологических производствах. Преимущества и недостатки энзимных технологий. Технология производства энзимов для промышленных целей. Требования, предъявляемые к продуцентам ферментов.

Иммобилизованные энзимы и преимущества их применения в биотехнологии. Носители, используемые для их иммобилизации: природные и синтетические органические. Типы неорганических носителей.

Способы иммобилизации энзимов: адсорбция, включение в гели и полупроницаемые мембраны, двухфазные системы; химические методы иммобилизации энзимов.

Иммобилизованные клетки в биотехнологии.

7. Молекулярная биотехнология как одно из направлений развития биотехнологии на современном этапе.

Получение рекомбинантных белков с помощью про- и эукариотических систем. Особенности производства белковых продуктов медицинского назначения. Использование достижений молекулярной биотехнологии в сельском хозяйстве и охране окружающей среды. Получение и использование трансгенных растений для повышения продуктивности сельского хозяйства и качества продуктов питания. Получение трансгенных

животных для продукции белков медицинского назначения. Возможные риски использования генетически модифицированных организмов (ГМО) для здоровья человека и окружающей среды.

Достижения молекулярной биотехнологии в генотерапии.

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКАЯ КАРТА УЧЕБНОЙ ДИСЦИПЛИНЫ

дневная форма получения высшего образования

Номер раздела, темы	Название раздела, темы	Количество аудиторных часов				Количество часов УСР	Форма контроля знаний
		Лекции	Практические занятия	Семинарские занятия	Лабораторные занятия		
1	2	3	4	5	6	7	8
1	Введение	2			-		
1.1	Введение						Фронтальный опрос
2.	Объекты биотехнологии	8			6		
2.1	Микроорганизмы (бактерии и высшие протисты) - основные объекты биотехнологии	2			2		Фронтальный опрос, тестирование, реферат
2.2	Выделение и селекция микроорганизмов, продуцентов биологически активных веществ	2			2		Фронтальный опрос, реферат
2.3	Использование клеточных культур в биотехнологических процессах	2			2		Фронтальный опрос, реферат
2.4	Трансгенные животные и растения как новые объекты биотехнологии	2					Фронтальный опрос, реферат
3.	Сырьевая база биотехнологии	4			-		
3.1	Требования, предъявляемые к питательным субстратам, используемым в биотехнологических процессах	2					Фронтальный опрос, тестирование, реферат

3.2	Природные сырьевые материалы растительного происхождения	2					Фронтальный опрос, реферат
3.3	Отходы различных производств, как сырье для биотехнологических процессов						Фронтальный опрос
3.4	Химические и нефтехимические субстраты, применяемые в качестве сырья для биотехнологии						Фронтальный опрос
4	Технологии ферментационных процессов	8			4		
4.1	Типы и режимы ферментации	4					Фронтальный опрос
4.2	Основные требования, предъявляемые к биореакторам	2					Фронтальный опрос, тестирование, реферат
4.3	Особенности культивирования клеток животных и растений	2			4		Фронтальный опрос
5.	Производство микробного белка	2			-		
5.1	Биотехнология производства «одноклеточного» белка	2					Фронтальный опрос, тестирование, реферат
5.2	Требования, предъявляемые к микробному белку и возможности его использования						Фронтальный опрос
5.3	Сырьевая база производства белка одноклеточных организмов; высокоэнергетические субстраты, отходы сельского хозяйства и других производств						Фронтальный опрос
6.	Ферментная технология	4			4		
6.1	Область применения энзимов в биотехнологических производствах. Преимущества и недостатки энзимных технологий	2			2		Фронтальный опрос
6.2	Требования, предъявляемые к продуцентам энзимов				2		Фронтальный опрос
6.3	Иммобилизованные энзимы и преимущества их применения в биотехнологии	2					Фронтальный опрос

6.4	Способы иммобилизации энзимов: адсорбция, включение в гели, полупроницаемые мембраны, двухфазные системы; химические методы						Фронтальный опрос
7.	Молекулярная биотехнология как одно из направлений развития биотехнологии на современном этапе	8			2		
7.1	Получение рекомбинантных белков с помощью про- и эукариотических систем	2					Фронтальный опрос
7.2	Особенности производства белковых продуктов медицинского назначения						Фронтальный опрос
7.3	Использование достижений молекулярной биотехнологии в сельском хозяйстве и охране окружающей среды	2					Фронтальный опрос, реферат
7.4	Получение трансгенных животных для продукции белков медицинского назначения						Фронтальный опрос, реферат
7.5	Возможные риски использования генетически модифицированных организмов (ГМО) для здоровья человека и окружающей среды	2					Фронтальный опрос, реферат
7.6	Достижения молекулярной биотехнологии в генотерапии	2			2		Фронтальный опрос, реферат
Итого:		36			16		Экзамен

ИНФОРМАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1 Перечень основной и дополнительной литературы

Основная литература

1. Евтушенков, А. Н. Введение в биотехнологию: курс лекций / А. Н. Евтушенков, Ю. К. Фомичев. – Мн.: БГУ, 2004.
2. Биотехнология: учебно-методическое пособие для лабораторно-практических занятий для студентов специальности 1-31 01 01 Биология (по направлениям) / Е.М. Волкова, В.Н. Никандров, Е.О. Юрченко, Т.М. Натынчик, Е.И. Приловская. – Пинск: ПолесГу, 2020. – 123 с.
3. Бирюков, В. В. Основы промышленной биотехнологии : учебное пособие / В. В. Бирюков. - М.: Колос С, 2004. - 296 с.
4. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. М.: Мир, 2002.
5. Егорова, Т.А. Основы биотехнологии : учебное пособие / Т. А. Егорова, С. М. Клунова, Е. А. Живухина. - 4-е изд. - М. : Академия, 2008. - 208 с.
6. Сельскохозяйственная биотехнология: учебник / В. С. Шевелуха [и др.]; под ред. В. С. Шевелухи – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. шк., 2003. - 469 с.
7. Загоскина, Н. В. Биотехнология: теория и практика, учебное пособие для вузов / Н. В. Загоскина, Л. В. Назаренко, Е. А. Калашникова, Е. А. Живухина. – М.: Изд. Оникс, 2009. – 496 с.

Дополнительная литература

8. Волова, Т. Г. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии [Электронный ресурс] : электрон. учеб. пособие / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая, П. В. Миронов. – Электрон. дан. (6 Мб). – Красноярск: ИПК СФУ, 2009. – 262 с.
9. Биотехнология: В 8 кн. / под ред. Н.С. Егорова и В. Д. Самуилова. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.studmed.ru/egorov-ns-red-biotehnologiya-kniga-1-problemy-i-perspektivy_ac350a29638.html#
10. Пшеничникова А.Б. Основы биотехнологии. Учебное пособие. М. 2010. – 92 с.
11. Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.nehudlit.ru/books/detail1184912.html>
12. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток. Практическое руководство. М.: Бином, 2010. – 691 с.

Ведение в биотехнологию

13. Блажевич О.В. Культивирование клеток. Курс лекций. Мн.: БГУ, 2004. – 78 с.
14. Грачева И.М. Технологи ферментных препаратов. Изд. 2-ое перераб. доп. Учебник. М.: Агропромиздат, 1987. – 335 с.
15. Гончаренко, Г.Г. Основы генетической инженерии / Г.Г. Гончаренко. - Мн.: Вышэйшая школа, 2005.
16. Албертс, Б. Молекулярная биология клетки / Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж и др. М.: Мир, 1994. Т.1-3.
17. Ермишин, А. П. Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика / А. П. Ермишин – Мн.: Тэхналогія, 2005.
18. Кузнецов, А. Е. Научные основы экобиотехнологии : учебное пособие / Кузнецов А.Е. - М. : Мир, 2006. - 504 с.
19. Промышленная микробиология: учебное пособие для вузов / З. А. Аркадьева [и др]; под ред. Н.С. Егорова. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://booksonchemistry.com/index.php?author=arkadeva-za&book=1989&category=biochem&id1=3>
20. Сазыкин, Ю.О. Биотехнология : учебное пособие / Ю.О. Сазыкин, С.Н.Орехов, И.И.Чакалева; ред. А.В.Катлинский. - 3-е издание, стереотипное. - М. : Академия, 2008. - 256 с.
21. Сельскохозяйственная биотехнология : учебник / В.С.Шевелуха, Е.А. Калашникова, Е.С. Воронин; ред. В.С. Шевелуха. - 2-е изд., испр. и доп. - М. : Высшая школа, 2003. - 469 с.
22. Щелкунов, С. Н. Генетическая инженерия: учебно-справочное пособие. 2-е изд, испр. и доп. – Новосибирск: Сиб унив. изд-во, 2004.
23. Черняк А.С. Основы биотехнологии металлов. Учебное пособие. Иркутск, изд-во Иркутск. ун-та, 2002, 102 с.

2 Перечень средств диагностики результатов учебной деятельности:

Оценка промежуточных учебных достижений студентов осуществляется при выполнении письменных контрольных работ и устного опроса на лабораторных занятиях. Оценка учебных достижений студента осуществляется на экзамене и производится по десятибалльной шкале.

Для текущего контроля качества усвоения знаний студентами используется следующий диагностический инструментарий:

- защита индивидуальных заданий при выполнении лабораторных работ;
- защита подготовленного студентом реферата;
- устные опросы;
- письменные контрольные работы по отдельным темам курса;
- проведение тестирования по модулям;
- компьютерное тестирование.

3 Примерный перечень заданий управляемой самостоятельной работы *(по данной дисциплине не предусмотрено)*

4 Технологии и методы обучения

Среди эффективных педагогических методик и технологий, которые способствуют вовлечению студентов в обучение и самостоятельного выполнения разнообразных задач, следует выделить:

- технологии проблемно-модульного обучения;
- технологии частично-поисковой деятельности;
- коммуникативные технологии (дискуссии и др.);
- информационно-коммуникационные технологии (презентации, мультимедиа и др.);
- игровые технологии.

Для управления учебным процессом и организации контрольно-оценочной деятельности рекомендуется использовать рейтинговые, системы оценки учебной деятельности студентов, управляемую самостоятельную работу, учебно-методические комплексы.

В целях формирования профессиональных компетенций выпускника вуза в практику проведения лекционных и лабораторных занятий целесообразно внедрять методики активного обучения (семинар, дискуссия, диспут и др.) и нетрадиционные форм.

5 Оборудование для учебного процесса

- Ламинарный шкаф
- Весы аналитические и прецизионные серии AdventurerPro AV264C, Adventurer RV3102
- Микроскоп инвертированный BDS300
- Микроскоп флуоресцентный BK6000 FL

Ведение в биотехнологию

- Центрифуга
- Автоклав
- Термостат
- Стационарный РН-метр
- Электрическая настольная плита

6 Примерный перечень лабораторных работ

1. Правила работы в микробиологической лаборатории. Устройство лаборатории.
2. Приготовление питательных сред для накопительных культур.
3. Методы стерилизации лабораторного оборудования и питательных сред.
4. Определение бактериальной обсемененности воздуха. Посев микрофлоры воздуха.
5. Изучение культуральных свойств выросших в чашках коллоний.
6. Техника посева и пересева микроорганизмов для создания чистых культур.
7. Качественно-количественный учет микрофлоры почвы. Посев микрофлоры почвы.
8. Количественный учет бактерий в пробах воды. Посев микрофлоры воды.

7 Примерный перечень реферативных работ

1. Микроорганизмы как основные объекты биотехнологии (или Роль микроорганизмов как объектов биотехнологии)
2. Методы селекции биотехнологических объектов
3. Применение химических и нефтехимических субстратов в биотехнологии.
4. Проект «Геном человека»: история, итоги.
5. Особенности «одноклеточного» белка и пути его использования.
6. Понятие об энзимах (ферментах) их использование в фармацевтической промышленности.
7. Общие понятия о хроматографии как методе очистки целевых продуктов, виды хроматографии.
8. Питательные среды для культивирования клеток животных и человека.
9. Применение иммобилизованных энзимов в различных областях биотехнологии.
10. Использование культур растительных клеток в биотехнологии для получения целевых продуктов.
11. Понятие о микробной металлургии, ее применение и значение.
12. Использование стволовых клеток в биотехнологии
13. Биотехнология белковых препаратов медицинского назначения

14. Использование в биотехнологии иммобилизованных клеток микроорганизмов
15. Производство генно-инженерного инсулина.
16. Биотехнология производства интерферонов и гормона роста.
17. Биотехнология и возобновляемые источники энергии

8 Примерный перечень вопросов к экзамену:

1. Биотехнология как межотраслевая область научно-технического прогресса и раздел практических знаний, этапы ее развития.
2. Основные факторы, обусловившие развитие современной биотехнологии.
3. Связи биотехнологии с биологическими, химическими, техническими и другими науками.
4. Области применения достижений биотехнологии.
5. Микроорганизмы (бактерии и высшие протисты) - основные объекты биотехнологии.
6. Преимущества микроорганизмов перед другими объектами в решении современных биотехнологических задач.
7. Принципы подбора биотехнологических объектов: модельные и базовые микроорганизмы, штаммы микроорганизмов, используемые в биотехнологии.
8. Выделение и селекция микроорганизмов, продуцентов биологически активных веществ.
9. Принципиальные подходы к улучшению штаммов промышленных микроорганизмов.
10. Промышленные ферменты, продуцируемые микроорганизмами.
11. Различия микроорганизмов по типу питания и отношению к кислороду.
12. Клетки животных и растений как объекты биотехнологии.
13. Использование клеточных культур в биотехнологических процессах.
14. Трансгенные животные и растения как новые объекты биотехнологии.
15. Требования, предъявляемые к питательным субстратам, используемым в биотехнологических процессах.
16. Природные сырьевые материалы растительного происхождения.
17. Отходы различных производств, как сырье для биотехнологических процессов.
18. Химические и нефтехимические субстраты, применяемые в качестве сырья для биотехнологии.
19. Преимущества и недостатки биотехнологических производств по сравнению с химическими технологиями.
20. Принципиальные схемы биотехнологических процессов, определяющие конструкции биореакторов (ферментеров).

Ведение в биотехнологию

21. Основные требования, предъявляемые к системам, используемым для процессов ферментации.
22. Типы и режимы ферментации. Периодические процессы.
23. Типы и режимы ферментации. Непрерывные процессы.
24. Проблемы аэрирования, пеногашения, асептики и стерильности при различных ферментациях.
25. Открытые и замкнутые ферментационные системы.
26. Хемостатные и турбидостатные режимы культивирования продуцентов.
27. Основные требования, предъявляемые к биореакторам.
28. Системы перемешивания, применяемые в современных ферментерах.
29. Принципы масштабирования технологических процессов: лабораторные, пилотные и промышленные ферментеры и решаемые с их использованием задачи.
30. Специализированные ферментационные технологии: анаэробные, твердофазные и газофазные процессы.
31. Особенности культивирования клеток животных, виды культур.
32. Особенности культивирования клеток растений.
33. Конечные стадии получения продуктов биотехнологических процессов.
34. Отделение биомассы: флотация, фильтрование и центрифугирование.
35. Методы дезинтеграции клеток: физические, химические и энзиматические.
36. Выделение целевого продукта: осаждение, экстрагирование, адсорбция, электрохимические методы, ионообменная хроматография.
37. Концентрирование, обезвоживание, модификация и стабилизация целевых продуктов биотехнологических процессов.
38. Биотехнология производства «одноклеточного» белка.
39. Продуценты «одноклеточного» белка: дрожжи и бактерии.
40. Продуценты «одноклеточного» белка: водоросли и грибы.
41. Требования, предъявляемые к микробному белку и возможности его использования.
42. Сырьевая база производства белка одноклеточных организмов; высокоэнергетические субстраты, отходы сельского хозяйства и других производств.
43. Область применения энзимов в биотехнологических производствах.
44. Преимущества и недостатки энзимных технологий.
45. Технология производства энзимов для промышленных целей.
46. Требования, предъявляемые к продуцентам энзимов.
47. Имобилизованные энзимы и преимущества их применения в биотехнологии.
48. Носители, используемые для иммобилизации энзимов: природные и

Ведение в биотехнологию

синтетические органические носители.

49. Типы неорганических носителей.

50. Способы иммобилизации энзимов: адсорбция, включение в гели и полупроницаемые мембраны; химические методы иммобилизации ферментов.

51. Иммобилизованные клетки в биотехнологии

52. Получение рекомбинантных белков с помощью прокариотических систем.

53. Классификация питательных сред и требования к их составу.

54. Использование достижений биотехнологии в охране окружающей среды.

56. Получение и использование трансгенных растений для повышения продукции сельского хозяйства и качества продуктов питания.

57. Способы идентификации трансгенной ДНК.

58. Возможные риски использования генетически модифицированных организмов (ГМО) для здоровья человека и окружающей среды.

59. Достижения молекулярной биотехнологии в генотерапии.

60. Биотехнология очистки промышленных отходов.

61. Биотехнологические способы получения энергоносителей.

62. Исследования генома человека и его результаты.

63. Получение рекомбинантных белков с помощью эукариотических систем.

64. Основные принципы получения трансгенных организмов.

Ведение в биотехнологию

ПРОТОКОЛ СОГЛАСОВАНИЯ УЧЕБНОЙ ПРОГРАММЫ

Название учебной дисциплины, с которой требуется согласование	Название кафедры	Предложения об изменениях в содержании учебной программы по учебной дисциплине	Решение, принятое кафедрой разработавшей учебную программу (с указанием даты и номера протокола)
Генетика	Кафедра биотехнологии	согласовано	Рекомендовать к утверждению учебную программу (№ 11 от 19.06.2020)
Биотехнология, принципы и применение	Кафедра биотехнологии	согласовано	Рекомендовать к утверждению учебную программу (№ 11 от 19.06.2020)
Молекулярная биология	Кафедра биотехнологии	согласовано	Рекомендовать к утверждению учебную программу (№ 11 от 19.06.2020)
Биохимия	Кафедра биохимии и биоинформатики	согласовано	Рекомендовать к утверждению учебную программу (№ 11 от 19.06.2020)

Ведение в биотехнологию

ДОПОЛНЕНИЯ И ИЗМЕНЕНИЯ К УЧЕБНОЙ ПРОГРАММЕ на _____ / _____ учебный год

№ п/п	Дополнения и изменения	Основание

Учебная программа пересмотрена и одобрена на заседании кафедры
биотехнологии (протокол № _____ от _____ 20__ г.)
(название кафедры)

Заведующий кафедрой
(ученая степень, ученое звание)

_____ (подпись)

_____ (И.О.Фамилия)

УТВЕРЖДАЮ
Декан факультета

_____ (ученая степень, ученое звание)

_____ (подпись)

_____ (И.О.Фамилия)

Ведение в биотехнологию

Критерии оценок результатов учебной деятельности:

Баллы	Показатели оценки
1 (один)	Отсутствие приращения знаний и компетентности в рамках образовательного стандарта, отказ от ответа
2 (два)	Фрагментарные знания в рамках образовательного стандарта; знания отдельных литературных источников, рекомендованных учебной программой дисциплины; неумение использовать научную терминологию дисциплины, наличие в ответе грубых и логических ошибок; пассивность на практических и лабораторных занятиях, низкий уровень культуры исполнения заданий
3 (три)	Недостаточно полный объем знаний в рамках образовательного стандарта; знание части основной литературы, рекомендованной учебной программой дисциплины; использование научной терминологии, изложение ответа на вопросы с существенными и логическими ошибками; слабое владение инструментарием учебной дисциплины, некомпетентность в решении стандартных (типовых) задач; неумение ориентироваться в основных теориях, концепциях и направлениях изучаемой дисциплины; пассивность на практических и лабораторных занятиях, низкий уровень культуры исполнения заданий
4 (четыре)	Достаточный объем знаний в рамках образовательного стандарта; усвоение основной литературы, рекомендованной учебной программой дисциплины; использование научной терминологии, логическое изложение ответа на вопросы, умение делать выводы без существенных ошибок; владение инструментарием учебной дисциплины, умение его использовать в решении стандартных (типовых) задач; умение под руководством преподавателя решать стандартные (типовые) задачи; умение ориентироваться в основных теориях, концепциях и направлениях по изучаемой дисциплине и давать им оценку; работа под руководством преподавателя на практических, лабораторных занятиях, допустимый уровень культуры исполнения заданий.
5 (пять)	Достаточные знания в объеме учебной программы; использование научной терминологии, грамотное, логически правильное изложение ответа на вопросы, умение делать выводы; владение инструментарием учебной дисциплины, умение его использовать в решении учебных и профессиональных задач; способность самостоятельно применять типовые решения в рамках учебной программы; усвоение основной литературы, рекомендованной учебной программой дисциплины; умение ориентироваться в базовых теориях, концепциях и направлениях по изучаемой дисциплине и давать им сравнительную оценку; самостоятельная работа на практических, лабораторных занятиях, фрагментарное участие в групповых обсуждениях, достаточный уровень культуры исполнения заданий.
6 (шесть)	Достаточно полные и систематизированные знания в объеме учебной программы; использование необходимой научной терминологии, грамотное, логически правильное изложение ответа на вопросы, умение делать обобщения и обоснованные выводы; владение инструментарием учебной дисциплины, умение его использовать в решении учебных и профессиональных задач; способность самостоятельно применять типовые решения в рамках учебной программы; усвоение основной литературы,

Ведение в биотехнологию

	рекомендованной учебной программой дисциплины; умение ориентироваться в базовых теориях, концепциях и направлениях по изучаемой дисциплине и давать им сравнительную оценку; активная самостоятельная работа на практических, лабораторных занятиях; периодическое участие в групповых обсуждениях, достаточно высокий уровень культуры исполнения заданий.
7 (семь)	Систематизированные, глубокие и полные знания по всем разделам учебной программы; использование научной терминологии (в том числе на иностранном языке), грамотное, логически правильное изложение ответа на вопросы, умение делать обоснованные выводы и обобщения; владение инструментарием учебной дисциплины, умение его использовать в постановке и решении научных и профессиональных задач; свободное владение типовыми решениями в рамках учебной программы; усвоение основной и дополнительной литературы, рекомендованной учебной программой дисциплины; умение ориентироваться в основных теориях, концепциях и направлениях по изучаемой дисциплине и давать им аналитическую оценку; самостоятельная работа на практических, лабораторных занятиях, участие в групповых обсуждениях, высокий уровень культуры исполнения заданий.
8 (восемь)	Систематизированные, глубокие и полные знания по всем поставленным вопросам в объеме учебной программы; использование научной терминологии (в том числе на иностранном языке), грамотное и логически правильное изложение ответа на вопросы, умение делать обоснованные выводы и обобщения; владение инструментарием учебной дисциплины (в том числе техникой информационных технологий), умение его использовать в постановке и решении научных и профессиональных задач; способность самостоятельно решать сложные проблемы в рамках учебной программы; усвоение основной и дополнительной литературы, рекомендованной учебной программой дисциплины; умение ориентироваться в теориях, концепциях и направлениях по изучаемой дисциплине и давать им аналитическую оценку; активная самостоятельная работа на практических, лабораторных занятиях, систематическое участие в групповых обсуждениях, высокий уровень культуры исполнения заданий.
9 (девять)	Систематизированные, глубокие и полные знания по всем разделам учебной программы; точное использование научной терминологии (в том числе на иностранном языке), грамотное, логически правильное изложение ответа на вопросы; владение инструментарием учебной дисциплины, умение его эффективно использовать в постановке и решении научных и профессиональных задач; способность самостоятельно и творчески решать сложные проблемы в нестандартной ситуации в рамках учебной программы; полное усвоение основной и дополнительной литературы, рекомендованной учебной программой дисциплины; умение ориентироваться в теориях, концепциях и направлениях по изучаемой дисциплине и давать им аналитическую оценку; систематическая, активная самостоятельная работа на практических, лабораторных занятиях, творческое участие в групповых обсуждениях, высокий уровень культуры исполнения заданий.

Ведение в биотехнологию

10 (десять)	Систематизированные, глубокие и полные знания по всем разделам учебной программы, а также по основным вопросам, выходящим за ее пределы; точное использование научной терминологии (в том числе на иностранном языке), грамотное, логически правильное изложение ответа на вопросы; безупречное владение инструментарием учебной дисциплины, умение его эффективно использовать в постановке и решении научных и профессиональных задач; выраженная способность самостоятельно и творчески решать сложные проблемы в нестандартной ситуации; полное и глубокое усвоение основной и дополнительной литературы по изучаемой учебной дисциплине; умение свободно ориентироваться в теориях, концепциях и направлениях по изучаемой дисциплине и давать им аналитическую оценку, использовать научные достижения других дисциплин; творческая самостоятельная работа на практических, лабораторных занятиях, активное творческое участие в групповых обсуждениях, высокий уровень культуры исполнения заданий.
-------------	--

Ведение в биотехнологию

ТЕСТЫ:

1. Сверхсинтез микроорганизма – это:
 - способность синтезировать определенный продукт в количествах, превосходящих физиологические потребности в естестве.
 - способность синтезировать определенный продукт в количествах, превосходящих физиологические потребности в искусственных условиях
 - способность усваивать продукт в количествах, превосходящих физиологические потребности в естественных условиях.

2. К универсальным физическим мутагенам относятся
 - ультрафиолетовое облучение
 - рентгеновские лучи
 - азотистый иприт
 - нитрозамины

3. К биологическим мутагенам относятся
 - рентгеновские лучи
 - фаги
 - грибы
 - уксусная кислота

4. Способ получения мутантных штаммов в генетической инженерии
 - генетическая рекомбинация *in situ*
 - генетическая рекомбинация в бактериальной клетке
 - генетическая рекомбинация *in vitro*

5. Рекомбинация – это
 - обмен генов в пределах одной хромосомы
 - обмен генами между двумя хромосомами
 - потеря части хромосомы

6. Отрасли, в которые внедряются достижения биотехнологии
 - сельское хозяйство
 - медицина
 - пищевая промышленность
 - материаловедение

7. Сколько фаз роста штаммов-продуцентов
 - 7
 - 3
 - 2
 - 5

8. Первичные метаболиты – это
- высокомолекулярные соединения, необходимые для роста микробов
 - низкомолекулярные соединения, необходимые для роста микробов
 - органические соединения с молекулярной массой более 1500 дальтон
 - неорганические соединения с молекулярной массой 1700 дальтон
9. Наиболее важные для промышленности метаболиты
- аминокислоты
 - сера
 - хлорид натрия
 - алканы
10. Вторичные метаболиты – это
- высокомолекулярные соединения, образующиеся на более поздних стадиях развития культуры, не требующиеся для роста микроорганизмов
 - низкомолекулярные соединения, образующиеся на более поздних стадиях развития культуры, не требующиеся для роста микроорганизмов
 - высокомолекулярные соединения, образующиеся на более поздних стадиях развития культуры, которые требуются для роста микроорганизмов
 - низкомолекулярные соединения, образующиеся на более поздних стадиях развития культуры, которые требуются для роста микроорганизмов
11. По содержанию кислорода культивирование микроорганизмов может быть
- аэробным
 - анаэробным
 - насыщенным
 - ненасыщенным
12. По количеству ферментеров культивирование микроорганизмов может быть
- одностадийным
 - двустадийным
 - многостадийным
 - динамическим
13. По наличию или отсутствию перемешивания культивирование микроорганизмов может быть
- аэробным
 - анаэробным

Ведение в биотехнологию

- динамическим
- статическим

14. По состоянию питательной среды культивирование микроорганизмов может быть

- поверхностным
- динамическим
- аэробным
- глубинным

15. Часть отходов, которая может быть использована в том же производстве

- вторичное сырье
- возвратные отходы
- безвозвратные потери
- шлаки

16. При анаэробной очистке сточных вод используют

- шахтные реакторы
- биофильтры, аэротенки
- биоскрубберы, биореакторы
- септитенки, метантенки

17. К элементам с очень высоким потенциалом загрязнения относятся

- серебро, олово, свинец
- мышьяк, фтор, рубидий
- уран, молибден, железо
- стронций, лантан, ниобий

18. К элементам со слабым потенциалом загрязнения относятся

- серебро, олово, свинец
- уран, молибден, железо
- стронций, ниобий
- мышьяк, фтор, рубидий

19. Каким методом определяется химическая потребность в кислороде

- химическим
- бихроматным
- биохимическим
- титриметрическим

20. Проекты малоотходной технологии должны предусматривать

Ведение в биотехнологию

- разработку способов переработки вторичных материальных ресурсов
 - рациональное использование земель и охрану окружающей среды, рациональное использование и экономное расходование материальных и топливно-энергетических ресурсов
 - выбор эффективных способов переработки ВМР
 - предельную допустимую концентрацию химического вещества в воздухе
21. Из какого количества слоев состоит структура аэробного биофильтра
- 7
 - 6
 - 5
 - 8
22. Аэротенк – это
- реактор с неподвижным слоем и противотоком воздуха
 - гомогенный биореактор, представляющий собой железобетонный сосуд, связанный с отстойником
 - отстойник, в котором осадок ила подвергается анаэробной дегградации
 - биореактор, биомасса которого растёт на поверхности насадки в виде пленки
23. Биотехнология – это
- наука о методах и технологиях производства различных ценных веществ и продуктов с использованием природных биологических объектов
 - наука о методах и технологиях производства различных ценных веществ и продуктов с использованием природных биологических объектов, частей клеток и процессов
 - наука о методах и технологиях производства различных ценных веществ и продуктов с использованием клеток
 - наука о методах и технологиях производства различных ценных веществ и продуктов с использованием природных процессов
24. Лигаза – это
- фермент, узнающий и атакующий определенные последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК
 - фермент, главной биологической функцией которого является синтез полимеров НК
 - фермент, катализирующий синтез ДНК на матрице РНК в процессе, называемом обратной транскрипцией
 - фермент, катализирующий соединение двух молекул с образованием

новой химической связи

25. Что такое микробиологический синтез
- процесс, который протекает с участием микроорганизмов и сопровождается образованием биомассы
 - о процесс, в результате которого образуется биомасса
 - о процесс, в результате которого получают микроорганизмы
 - о процесс, который протекает без участия микроорганизмов и сопровождается образованием биомассы
26. Рестриктазы – это
- ферменты, узнающие и атакующие определенные последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК
 - о ферменты, главной биологической функцией которого является синтез полимеров НК
 - о ферменты, катализирующие соединение двух молекул с образованием новой химической связи
 - о ферменты, катализирующие синтез днк на матрице РНК в процессе, называемом обратной транскрипцией
27. Как можно ввести ген в клетку
- о это невозможно
 - о при помощи векторов
 - о прямое введение
 - при помощи векторов и прямого введения
28. Вектор – это
- о молекула белка, используемая в генетической инженерии для передачи генетического материала другой клетке
 - молекула НК, чаще всего ДНК, используемая в генетической инженерии для передачи генетического материала другой клетке
 - о молекула НК, чаще всего РНК, используемая в генетической инженерии для передачи генетического материала другой клетке
 - о молекула нуклеиновой кислоты, чаще всего ДНК, не пригодная для передачи генетического материала другой клетке
29. Основным компонентом для получения биогаза является
- о бутан
 - о этан
 - метан
 - о пропан

30. Перенос бактериальной ДНК из одной клетки в другую бактериофагом называется
- трансфекцией
 - трансдукцией
 - трансформацией
 - электропорацией
31. Какие основные стадии включает биотехнологический процесс
- простоя, сложная, обратная
 - предферментационная, ферментативная, постферментативная
 - процессинг, трансляция
 - терминация, окисление
32. Первый антибиотик
- аминогликозиды
 - тетрациклин
 - пенициллин
 - полимиксины
33. Важным направлением биотехнологии является производство и использование так называемых иммобилизованных
- белков
 - ферментов
 - углеводов
 - жиров
34. Растения и животные, геном которых изменен путем генноинженерных операций, называются
- трансгенными растениями или трансгенными животными
 - клонами
 - гибридами
 - популяциями
35. Соматическая гибридизация – это
- копирование (клонирование) этого гена в новом хозяине с обеспечением его работы
 - введение гибридной плазмидной ДНК, содержащей нужный ген, в клетки хозяина
 - растения, в геном которых встроены (интегрированы) клонированные гены
 - слияние двух различных клеток в культуре тканей

Ведение в биотехнологию

36. Технологическая биоэнергетика – это
- о выведение сортов растений, устойчивых к неблагоприятным факторам
 - одно из направлений биотехнологии, связанное с эффективным использованием энергии, запасаемой при фотосинтезе
 - о перспективный метод получения не только новых сортов, но и промышленно важных продуктов
 - о метод, позволяющий получать регенеранты из тканей верхушечных почек растений
37. Производством лекарств, гормонов и других биологических веществ занимается такое направление, как
- о агрономия
 - о генная инженерия
 - биотехнологическое производство
38. Одним из преимуществ микроорганизмов как биообъектов является
- о малые размеры
 - «простота» организации генома
 - о большая распространенность
39. К биопестицидам не относятся
- о грибы
 - о вирусы
 - споры
40. Вакцины – это препараты, содержащие
- антигены одного или нескольких возбудителей инфекционных заболеваний
 - о комплекс антибиотиков для лечения инфекционной патологии
 - о комплекс витаминов для поддержания иммунитета
41. Преимуществом генно-инженерного инсулина перед животным является
- о высокая активность
 - меньшая аллергенность
 - о меньшая токсичность
42. Активный ил, применяемый при очистке сточных вод – это
- о сорбент
 - о смесь микроорганизмов, полученных генно-инженерными методами
 - природный комплекс микроорганизмов

43. Технологический воздух для биотехнологического производства стерилизуют
- нагреванием
 - фильтрованием
 - облучением
44. Питательные среды для культур растительных клеток отличаются от питательных сред для микроорганизмов и клеток животных обязательным наличием
- углеводов
 - соединений азота и фосфора
 - фитогормонов
45. Сколько стадий включает биотехнологическое производство
- 2
 - 3
 - 5
 - 6
46. Какой биогаз можно использовать (после предварительной очистки) в качестве горючего для двигателей внутреннего сгорания
- неочищенный биогаз
 - природный газ
 - очищенный биогаз
 - компремированный биогаз
47. Какой фермент обычно применяют для створаживания молока при производстве сыра
- реннин
 - термамил
 - глюковаморин
 - амилосубтилин
48. В основе пивоварения лежит
- уксуснокислое брожение
 - молочнокислое брожение
 - спиртовое брожение
 - маслянокислое брожение
49. Бактерии семейства *Lactobacteriaceae* обеспечивают
- спиртовое брожение

Ведение в биотехнологию

- маслянокислое брожение
- молочнокислое брожение
- уксуснокислое брожение

50. «Гидролизный» спирт получают при сбраживании

- глюкозы
- картофеля
- древесины
- молока

51. На основе В-лимфоцитов и Т-лимфоцитов создают

- гибридомы
- векторы
- эритроциты
- нуклеотиды

52. Недостаток вирусов как векторов

- продукты экспрессии легкодоступны
- уровень экспрессии генов слишком велик
- способность заражать ограниченный круг хозяев
- доступны для использования

53. Биогаз на 85% состоит из

- этана
- пропана
- бутана
- метана

54. Для усиления вкуса в пищевой промышленности применяют

- амилазы
- либазы
- уксусную кислоту
- глутамат

55. Начальная стадия биотехнологической утилизации ТБО включает

- анаэробные процессы
- аэробные процессы
- восстановительные процессы
- поглотительные процессы

56. В сельском хозяйстве для увеличения выхода мясной продукции могут использовать

Ведение в биотехнологию

- комплексы минералов
 - гормоны роста
 - витаминный комплекс
 - противовирусные препараты
57. Метановое брожение – это созревание метанового биоценоза и
- ферментация
 - изоляция
 - транслокация
 - рекомбинация
58. Сколько пар нуклеотидов содержит искусственная хромосома
- 40-50
 - 100-120
 - до 100
 - 150-300
59. Разделение веществ, при котором биомасса всплывает на поверхности культуральной жидкости, называется
- фильтрацией
 - флотацией
 - сепарацией
60. Первыми объектами генной инженерии стали
- *S.cerevisiae*
 - *B.subtilis*
 - *E.coli*
61. Методы клеточной инженерии селекционеры используют с целью получения
- гибридных клеток и выращивания из них гибридов
 - кормового белка для питания животных
 - пищевых добавок для продуктов питания
 - эффективных лекарственных препаратов
62. Для получения вин используют
- молочнокислые бактерии
 - актиномицеты
 - дрожжи
63. Молочнокислые бактерии встречаются
- в почве

Ведение в биотехнологию

- в воде
 - в молоке и молочных продуктах
64. Какими методами получают гормон роста
- методами клеточной инженерии
 - методами генной инженерии
 - методами хромосомной инженерии
65. Какой белок был впервые получен методами современной биотехнологии
- интерферон
 - инсулин
 - гормон роста
66. К появлению какой науки привело активное внедрение биотехнологий в медицину и генетику человека
- этики
 - эстетики
 - биоэтики
67. Трансгенные организмы получают путем ввода чужеродного гена в
- соматическую клетку
 - яйцеклетку
 - митохондрии
68. Прямой перенос чужеродной ДНК в протопласты возможен с помощью
- гибридом
 - трансформации
 - упаковки в липосомы
 - микроинъекции
69. Микроорганизмы, хорошо переносящие холод называются
- мезофилами
 - термофилами
 - психрофилами
70. Более легкую приспособляемость к среде обитания имеют
- клетки растений
 - микробы
 - клетки животных
 - ткани растений

71. «Ген-маркер» необходим для
- повышения активности рекомбинанта
 - отбора рекомбинантов
 - повышения устойчивости рекомбинанта
 - образования компонентных клеток хозяина
72. Способ сохранения нужной биотехнологу продуктивности культур микроорганизмов
- в сыпучих материалах
 - в холодильнике
 - криосохранение
 - сублимационное высушивание
73. Сыворотка – это
- сложная смесь крупных и мелких молекул, которые способны вызывать быстрый рост и тормозить рост
 - жидкость, которая остается после сворачивания и процеживания молока
 - препарат, предназначенный для создания иммунитета к инфекционным болезням
 - ведение в организм ослабленных или разрушенных возбудителей заболеваний
74. На какие две группы делятся процессы культивирования
- периодические и непрерывно-проточные
 - статические и динамические с перемешиванием
 - статические и периодические
 - периодические и динамические
75. Назовите фазы ростового цикла
- латентная фаза
 - экспоненциальная фаза
 - фаза замедленного роста и стационарная фаза
 - все перечисленные
76. Суспензионная культура – это
- суспензия клеток, находящаяся во взвешенном состоянии при использовании аппаратуры, обеспечивающей их аэрацию и перемешивание
 - суспензия агрегатов клеток в жидкой среде без использования аппаратуры
 - суспензия клеток или их агрегатов во взвешенном состоянии в

жидкой среде

- суспензия клеток или их агрегатов во взвешенном состоянии в жидкой среде, при использовании аппаратуры, обеспечивающей их аэрацию и перемешивание

77. Генетическая инженерия растений ограничивается
- о меньшей изученностью, по сравнению с млекопитающими
 - о не для всех растений удается подобрать условия регенерации
 - о лимитирующим фактором - размером фрагмента донорной ДНК
 - всем перечисленным

78. Конструирование фрагментов рекомбинантной ДНК (сшивки) бывает

- о механическим
- по «тупым» концам и по одноименным «липким» концам
- о энзиматическим

79. Назовите основные этапы создания трансгенных организмов

- о получение нужного гена, намеченного для переноса
- о молекулярная селекция и создание специальных генетических конструкций (векторов)

- о генетическая трансформация
- все перечисленное

80. В качестве векторных молекул могут служить

- плазмиды бактерий
- о РНК бактериофагов или вирусов
- о ДНК грибов

81. Какую роль играет ДНК-полимераза в естественных условиях

- восстанавливающую
- о окислительную
- о окислительно-восстановительную
- о правильного ответа нет

82. Молекула ДНК (РНК), способная переносить чужеродные гены в клетки реципиента – это

- вектор
- о плазмиды
- о локус
- о вирусы

83. Плазмидные векторы для работы в клетках разных органов – это
- орпазмиды
 - транспозоны
 - челночные векторы
 - космиды
84. Ядовитые вещества, используемые для борьбы с вредителями, болезнями, сорняками – это
- пестициды
 - амилазы
 - гербициды
 - эндотоксины
85. С помощью какого фермента происходит сшивка по тупым концам
- ДНК-лигазы
 - ДНК-рестриктазы
 - ДНК-полимеразы
 - ДНК-полимеразы II
86. Какой тип биореактора наиболее распространен
- биофильтр
 - механический биореактор
 - электрический биореактор
 - химический биореактор
87. Трансверсия – это вид внутригенной мутации, заключающийся
- в замене пурина на пиримидин и наоборот
 - в замене пурина на другой пурин
 - в замене пиримидина на другой пиримидин
 - в замене любого нуклеотида на пурин
88. Бактериальный фермент, расщепляющий молекулу ДНК в строго специфичных сайтах – это
- рестриктаза
 - моноклональное антитело
 - вирус
 - гибрид
89. Сшивают фрагменты ДНК за счет фосфодиэфирных связей
- ревертазы
 - лигазы
 - рестриктазы

- обратные рестриктазы
- 90. Какие фазы включает метановое брожение
 - кислотную и метановую
 - кислотную и щелочную
 - кислую
 - щелочную
- 91. Какая стоимость продукции биотехнологии маломасштабного производства
 - низкая
 - очень низкая
 - средняя
 - высокая
- 92. Какие этапы включает биоочистка сточных вод
 - механический и биологический
 - механический и физический
 - физический и химический
 - механический
- 93. На какой стадии биологического процесса образуются целевые продукты
 - 1-й
 - 2-й
 - 3-й
 - на всех
- 94. Третья стадия биотехнологического процесса – это
 - предферментационная
 - постферментационная
 - ферментационная
 - стабилизационная
- 95. Основу питательных сред чаще всего составляют солевые растворы
 - Хенкса и Эрла
 - Хенкса
 - Эрла
 - Овчинникова
- 96. Тип питания культуры тканей растения
 - ауксотрофный

- хемогетеротрофный
 - фотоавтотрофный
 - хемолитотрофный
97. Экстракция каротина из высушенной биомассы осуществляется
- подсолнечным маслом
 - вазелиновым маслом
 - летучим органическим растворителем
 - раствором щелочи
98. Выделение тетрациклинов из культуры жидкости проводят методами
- ионообменной хроматографии
 - экстракции органическими растворителями
 - ультрафильтрации
 - осаждения
- 17 99. Препараты пробиотиков, содержащих кишечную палочку штамм М-
- нормофлор
 - гастрофарм
 - бификол
 - линекс
100. Симбиозом называют
- тесные мутуалистические связи
 - тесные аменсалитические связи
 - тесные комменсалитические связи
101. РНК-зонды
- формируют иммунитет против вирусов
 - обнаруживают продукты экспрессии генов
 - обнаруживают наличие генов
 - формируют иммунитет против чужеродной ДНК
102. Год рождения генной инженерии
- 1971
 - 1972
 - 1973
 - 1974
103. Антибиотики относятся к

- антисептикам
- химиотерапевтическим средствам
- дезинфекторам

104. Как называется превращение одних веществ в другие с помощью микроорганизмов

- биоконверсия
- симбиоз
- биотранспорт
- симпласт

105. Персистенция - это

- адсорбция вируса
- проникновение вируса в клетку
- гибель вируса
- переход вируса в латентное состояние

106. Клеточный белок, препятствующий размножению вирусов

- интерферон
- инсулин
- глюкагон
- тимин

107. Получение гаплоидных растений на искусственной питательной среде из изолированных пыльников и микроспор - это

- гиногенез
- партеногенез
- андрогенез
- хемотерапия

108. Сплайсинг - это

- удаление последовательностей, не кодирующих белковые продукты
- увеличение числа копий молекул ДНК
- начало репликации ДНК
- конец репликации ДНК

109. Для введения ДНК в клетки растений наиболее пригодны

- липосомы, состоящие из фосфатилсерина и холестерина
- липосомы, состоящие из полисахаридов и жиров
- липосомы, состоящие из моносахаридов и жиров
- липосомы, состоящие из холестерина и жиров

Ведение в биотехнологию

110. В каком году были получены трансгенные овцы, продуцирующие с молоком человеческий «фактор 9» для лечения гемофилии

- 1990
- 2005
- 1997
- 2000

111. Основные направления применения биотехнологии

- повышение скорости роста животных
- повышение показателей молочной продуктивности
- улучшение качественных показателей продуктивности животных

112. Получен крупный рогатый скот с примесью крови зебу, который устойчив к

- ряду кровепаразитарных заболеваний
- заболеваниям сердечно-сосудистой системы
- заболеваниям нервной системы
- заболеваниям печени

113. В плане производства сыров представляет интерес увеличение содержания в коровьем молоке

- жира
- лактозы
- иммуноглобулина
- казеина

114. Лактоза – это

- основной сахар молока
- феромон, выделяющийся при лактации
- один из половых гормонов, который стимулирует лактацию
- белок молока

115. Рекомбинантные белки, полученные из молока трансгенных животных

- человеческий белок С
- альфа-1-антитрипсин
- химозин
- гемоглабин

116. Под клоном понимают

многочисленное потомство одной исходной особи, имеющее идентичный фенотип

Ведение в биотехнологию

- многочисленное потомство нескольких родительских форм, имеющее идентичный генотип
 - многочисленное потомство одной исходной особи, имеющее идентичный генотип
- многочисленное потомство одной исходной особи, имеющее идентичный фенотип, но различный генотип

117. Основные направления в клонировании животных

- пересадка ядер из соматических клеток в энуклеированную яйцеклетку
- получение гомозиготных диплоидных потомков
- создание партеногенетических животных

118. Лекарственные средства в мировой практике, полученные от трансгенных животных

- факторы свертываемости крови против гемофилии
- тканевой плазменно-генный активатор, применяемый при лечении венозных тромбов и поражении легочной артерии
- человеческий белок С для предотвращения образования тромбов
- моноклональные антитела для лечения различных форм рака

119. В каком году Республика Беларусь присоединилась к Картахенскому протоколу

- 2002
- 2009
- 1999
- 1985

120. Среди методов прямого переноса генов в растительные клетки наибольшее распространение получил метод

- биологической баллистики
- микроинъекции
- химический

121. Недостатки биологической баллистики как способа переноса генов в клетки растений

- применим лишь для двудольных растений
- нежелательная для трансформации растений многокопийность вставок, разрушение части вносимых генных конструкций
- низкая частота трансформаций

122. Процесс агробактериальной трансформации инициируется прежде

Ведение в биотехнологию

всего

- o обработкой растения щелочью
- o обработкой растения кислотой
- o обработкой растения ледяным раствором CaCl_2
- повреждением растения, например, механическим путем

123. Репортерные гены применяют для изучения

- регуляторных элементов генов
- o сочетаний аллелей гена
- o структурно-функциональной организации генома

124. Для получения многоклеточных ГМО поначалу трансформируют нужный ген

- o в многоклеточный организм
- o в многоклеточный или одноклеточный организм
- в отдельные клетки, из которых затем восстанавливают целый организм

125. Для получения трансгенных животных чаще всего используют

- o неоплодотворенные яйцеклетки
- оплодотворенные яйцеклетки
- o соматические клетки
- o стволовые клетки

126. Способы культивирования клеток растений *in vitro*

- на твердых (агаризованных) питательных средах
- на жидких питательных средах
- o в фосфатно-солевом растворе

127. Каллюс – это

- неорганизованная, активно пролиферирующая ткань, состоящая из недифференцированных клеток
- o организованная, активно пролиферирующая ткань, состоящая из недифференцированных клеток
- o неорганизованная, активно пролиферирующая ткань, состоящая из дифференцированных клеток

128. Протопласты получают из

- клеток паренхимы листа, каллюсных культур, суспензионных культур
- o бактериальных клеток
- o целлюлозной оболочки растительной клетки

129. Целлюлозные оболочки растительных клеток растворяют при помощи

- рестриктаз
- полимераз
- кислот
- целлюлаз

130. Чтобы не повредить внутреннее содержимое растительной клетки в ходе и после удаления целлюлозных оболочек в питательную среду обязательно добавляют

- осмотики
- целлюлазы
- ауксины
- цитокинины

131. Культивирование клеток растений

- во многом аналогично культивированию микроорганизмов
- в корне отличается от культивирования микроорганизмов
- идентично культивированию микроорганизмов

132. Способы регенерации растений в культуре *in vitro*

- эмбриогенез
- партеногенез
- органогенез
- клонирование

133. Карты генетического сцепления показывают

- сочетания аллелей в гене
- взаимное расположение хромосом
- порядок расположения генов на хромосоме и относительные расстояния между ними

134. Карта генома – это

- графическая схема, позволяющая ориентироваться в геноме, искать в нем места, которые могут быть важны и интересны
- схема порядка расположения генов на хромосоме и относительные расстояния между ними
- схема взаимного расположения хромосом

135. Явление встречающегося в популяции измененного сайта рестрикции, приводящее к образованию специфического набора фрагментов ДНК, называется

- генетической структурой
- частотой встречаемости аллелей
- полиморфизмом длины рестрикционных фрагментов.

136. Преобладание в питательной среде ауксинов над цитокининами, как правило, стимулирует

- образование стеблей
- образование корней
- образование листьев

137. Преобладание в питательной среде цитокининов над ауксинами, как правило, стимулирует

- образование стеблей
- образование корней
- образование листьев

138. Промежуточное соотношение в питательной среде цитокининов и ауксинов оказывает благоприятное влияние на

- образование стеблей
- образование корней
- образование листьев
- пролиферацию каллюса

139. Тотипотентность животные соматические клетки проявляют

- на поздних стадиях развития
- на самых ранних стадиях развития
- тотипотентность для них нехарактерна

140. Для получения генно-инженерного многоклеточного организма обычно трансформируют

- эмбриональные клетки на ранних стадиях развития эмбриона
- соматические клетки
- эмбриональные клетки на поздних стадиях развития эмбриона
- яйцеклетку

141. В живой клетке высших организмов ДНК содержится

- лишь в ядре
- в ядре и пластидах
- в ядре, пластидах, митохондриях