

Б 28

А51

К.Х. Алмагамбетов



ОСНОВЫ
БИОТЕХНОЛОГИИ

828
A51

Алмагамбетов К.Х.

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Астана, 2006

828.04

ББК 30.16
А 51

Алмагамбетов К.Х.

М 51 Основы биотехнологии: Астана, 2006. Стр. 200.

ISBN 9965-25-582-2

Рецензенты: д.б.н., проф. Жубанова А.А., д.б.н., проф. Валиханова Г.Ж., д.б.н., проф. Иващенко А.Т., д.б.н., проф. Абиев С.А., д.б.н. Жамбакин К.Ж.

Книга содержит общие сведения о трех объектах биотехнологии – микробных, растительных и животных организмах.

Для специалистов, работающих в области биотехнологии, студентов, аспирантов, преподавателей.

619229



© Алмагамбетов К.Х., 2006
© Республиканская коллекция
микроорганизмов
НЦБ МОН РК, 2006 г.

ISBN 9965-25-582-2

I. ВВЕДЕНИЕ

Биотехнология относится к стремительно развивающимся направлениям научно-технического прогресса. Ее основой, фундаментальной частью являются клеточная и молекулярная биология, клеточная и генетическая инженерия, микробиология и биохимия. Надстройкой, прикладной частью можно назвать биотехнологическое производство, развивающееся на базе современных инженерных технологий.

Биотехнология востребована во многих отраслях производственной деятельности, включая фармацевтику и медицину, легкую и пищевую промышленность, растениеводство, ветеринарию и животноводство, экологию и горнорудное производство и др.

Классическая биотехнология, основанная на традиционных методах селекции уступила передовые позиции научным исследованиям и практическим разработкам нетрадиционной биотехнологии-технологии рекомбинантной ДНК. В научном мире стали обыденными термины-трансгенные растения, трансгенные животные, генетически модифицированные микроорганизмы.

Коммерциализация биотехнологических разработок приносит миллиардные прибыли, создает весомые предпосылки для экономического роста государства.

Развитие биотехнологической науки, ее устоявшиеся и выверенные практикой результаты пополняют образовательные программы по данной дисциплине. Это монографии, учебники и пособия по сельскохозяйственной биотехнологии, про-

мышленной биотехнологии, экологической биотехнологии и др. Вместе с тем, для тех кто начинает познавать основы биотехнологии порой сложно в целом охватить сегодняшние знания в этой области.

В книге сделана попытка в некой последовательности (объект, способы его создания, типовые биотехнологические процессы с использованием объекта, биотехнологическая продукция) изложить известные сведения, охватывая все три объекта – биопродуцента (клетки микробного, растительного и животного происхождения).

II. ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ

Биотехнологию (БТ) целесообразно рассматривать в связи с историей ее развития и становления как самостоятельного направления биологической науки, как отдельной производственной технологии. Рационально рассматривать БТ с позиции ее основы, с позиции того, что является объектом настоящей дисциплины. Основой, объектом биотехнологии являются живые клетки, а именно клетки животного, растительного или микробного происхождения, либо их биологически активные метаболиты, либо хозяйственно ценные породы животных и сорта растений.

Первое определение термина БТ было дано К. Эреки в 1917 году применительно к результатам его работы по повышению продуктивности свиней при кормлении их сахарной свеклой. Он писал: «Биотехнология – это все виды работ, при которых из сырьевых материалов с помощью животного организма производятся те или иные продукты».

По мере развития естественно-технических наук, биологической науки, генетики и биохимии клеток совершенствовались, усложнялись и расширялись технологии с использованием биологических объектов; появились специализированные производства в промышленном масштабе (молоко, – спиртзаводы, кожевенные предприятия и др.), на основе достижений клеточной инженерии разрабатываются новые технологии с использованием культуры клеток. Естественно в историческом плане, по мере развития биотехнологии отмечаются соответствующие изменения и дополнения в определении сущности БТ как науки.

Поэтому со времени появления биотехнологического производства в промышленном масштабе БТ определяют как науку о методах и технологиях производства, транспортировки, хранения и переработки сельскохозяйственной и другой продукции с использованием животных, растений и микроорганизмов.

В 80-е годы прошлого столетия Европейская биотехнологическая федерация определяла БТ как совместное использова-

ние биохимических, микробиологических и химических технологий для промышленного применения полезных качеств микроорганизмов и культур тканей.

Она рассматривала биотехнологию как междисциплинарную область научно-технического прогресса, возникшую на стыке биологических, химических и технических наук, как интегрирование знаний в области биохимии, микробиологии, молекулярной биологии и прикладных наук в технологических процессах с использованием микроорганизмов, культур клеток и тканей. Биотехнологические процессы применимы на различных уровнях организации живой материи: клеточном, органно-тканевом, организменном, популяционном, биоценологическом.

В последующем на основе знаний о биохимии и генетике живой клетки, о технологии наращивания биомассы клеточных культур биотехнологии понимаются как технологии получения разнообразных, необходимых человеку продуктов из живых клеток различного происхождения (животного, растительного и микробного). Дальнейшее развитие молекулярной биологии и генетической инженерии привнесло в терминологию следующее:

– биотехнология – это управляемое получение полезных для народного хозяйства, а также медицины целевых продуктов с помощью биологических агентов – микроорганизмов, вирусов, клеток животных и растений, а также с помощью внеклеточных веществ и компонентов клеток;

– биотехнология – это промышленное использование биологических процессов и агентов на основе получения высокоэффективных форм микроорганизмов, культур клеток и тканей растений и животных с заданными свойствами;

– биотехнология – это наука, связанная с разработкой, совершенствованием технологических процессов с использованием в качестве продуцентов животных, растений и микроорганизмов для хозяйственно-полезных целей, для медицинской практики, для улучшения экологии и др.

Таким образом биотехнологию можно трактовать как дисциплину, занимающуюся процессами, технологией и аппаратурой для получения нужных народному хозяйству продуктов (медикаментов, реактивов, средств защиты растений, бактериаль-

ных удобрений, кормовых добавок и др.) или деградацией отходов при помощи микроорганизмов, в том числе вирусов, тканевых и растительных клеток или их компонентов.

Становление нового научного направления в области биологии – генетической инженерии, конструирование *in vitro* функционально активных генетических структур – рекомбинантных ДНК, модифицирование природного генотипа родительской клетки с соответствующим изменением фенотипических свойств последней, создание первой рекомбинантной ДНК, состоящей из фрагмента ДНК вируса ОВ 40 и бактериофага лямбда *dvgalc* галактозным опероном *E. coli* (Берг, 1972) явилось началом нетрадиционной биотехнологии – молекулярной биотехнологии, биотехнологии рекомбинантных ДНК. Поэтому нужно признать, что генетическая инженерия как ядро новой биотехнологии является прямым потомком молекулярной генетики, молекулярной биологии; а у традиционной биотехнологии – основа микробиология, микробиологическое производство.

Конечно же, в определении биотехнологии как научной дисциплины, ее задачах и целях могут быть отраслевые оттенки (сельскохозяйственная биотехнология, ветеринарная биотехнология, медицинская биотехнология, экологическая биотехнология, промышленная биотехнология и другие направления).

Слова «биология» и «биотехнология» различаются лишь в том, что в слове «биотехнология» есть вставка «техно». И биология и биотехнология имеют дело с живыми объектами, но как различны их подходы к живому. Биотехнолог изучает живое не из чисто познавательного интереса, он пытается «заставить» работать живые объекты, производить нужные человеку продукты. «Зачем брать на себя труд изготовления химических соединений, если микроб может сделать это за нас?» – говорил Дж. Холдейн еще в 1928 году, предвосхищая грядущий расцвет биотехнологии.

Биотехнология сформировалась на базе ряда биологических дисциплин, используя современные инженерные технологии и аппаратуру; сформировалась на стыке биологических, химических и технических наук.

Основой становления, развития биотехнологии, как одной из ветвей биологической науки явились фундаментальные знания физиологии и биохимии живой клетки, достижения в области генетики, молекулярной биологии и генной инженерии, инженерной энзимологии и ферментационной технологии.

Естественно, биотехнология как научная дисциплина и производственная технология акцентируется на исследовании биопroduцирующей активности живой клетки, на целенаправленной работе по совершенствованию, созданию новых биологических объектов, обладающих более качественной продуцирующей способностью и используемых в самых различных отраслях: сельском хозяйстве, фармацевтике, пищевой промышленности, биоэнергетике, ремедиации окружающей среды, биоэлектронике и др. Достижения в различных областях науки плодотворно используются в биотехнологии (рис. 1).

Биотехнология как современная отрасль высоких технологий, основой которой является биология, биологические процессы с живыми организмами развивается по различным самостоятельным научным направлениям: сельскохозяйственная, фармацевтическая, промышленная, экологическая, молекулярная биотехнология, иммунобиотехнология и др.

Сельскохозяйственная биотехнология.

Это направление охватывает растениеводство, животноводство и ветеринарию. Создание сельскохозяйственных культур, сбалансированных по содержанию белка, углеводов, жиров, минеральных элементов, витаминов на основе достижений клеточной биотехнологии и тотипотентности растительных клеток, клональном микроразмножении и ускоренном получении новых линий сельскохозяйственных растений, используемых в селекции на устойчивость, продуктивность и качество; оздоровление растений от вирусов; получение биологически активных веществ и кормовых белков растительного происхождения; сохранение ценных генотипов; использование изолированных клеток, генно-инженерных технологий в селекции растений, дающих сорта и линии, устойчивые к засухе.

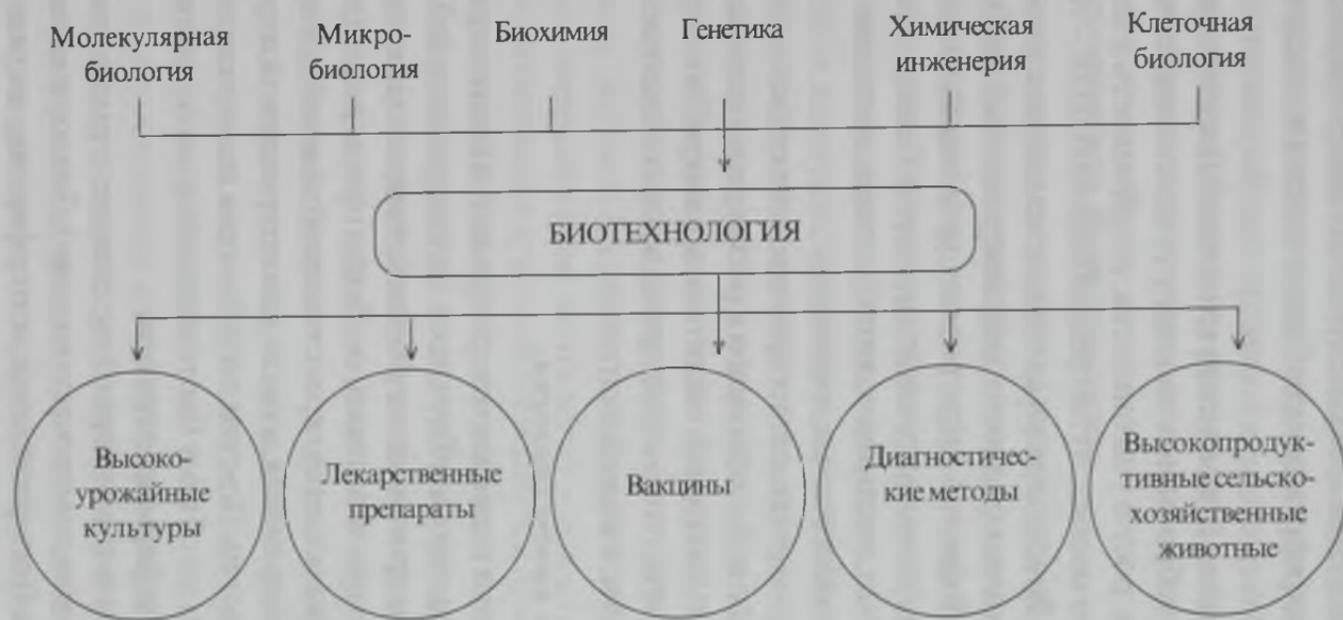


Рис.1. Биотехнология использует достижения многих областей науки и позволяет создавать широкий ассортимент коммерческих продуктов и методов

засолению, низким температурам, к фитопатогенам, тяжелым металлам; разработка генетических основ повышения эффективности использования азотфиксирующих микроорганизмов, клубеньковых микроорганизмов; биологического консервирования кормов.

В животноводстве применение клеточной биотехнологии, трансплантации эмбрионов позволяет улучшать хозяйственно-ценные свойства: рост и упитанность, устойчивость к инфекции, высокие удои молока; путем рекомбинатной ДНК – технологии получают биологически активные вещества с молоком трансгенных животных (человеческий сывороточный альбумин, антигемофильный фактор, антитрипсин, урокиназа, химозин и др.); столь же актуально получение кормовых белков, незаменимых аминокислот, витаминов, антибиотиков, пополняющих рацион сельскохозяйственных животных.

Актуальна задача уменьшения применения в сельском хозяйстве средств химизации, пестицидов и расширение использования бактериальных удобрений, инсектицидов микробного происхождения; разработка генно-инженерных вакцин и диагностикумов на основе моноклональных антител.

Медицинская биотехнология.

Один из основных периодов истории развития биотехнологии – это период открытия антибиотиков, их получение в лабораторных условиях и производство в промышленных масштабах. Разработка новых антибиотиков, особенно природного происхождения и сегодня остается первостепенной задачей для практического здравоохранения, а также для ветеринарной и пищевой промышленности. По-сути, антибиотики являются самым большим классом по объему биотехнологического производства и потребления фармпрепаратом.

Востребованы в современной медицине гормональные препараты (инсулин, соматотропин и др.), биологически активные вещества (интерлейкины, интерфероны, активатор плазминогена крови, антигемофильный фактор и др.), генно-инженерные вакцины (субъединичные, пептидные, «вектор-

ные»), диагностикумы на основе моноклональных антител, тест-системы для детекции нуклеиновых кислот и др.

Расширяется производство и использование фитопрепаратов (алкалоиды, гликозиды, стероиды, эфирные масла и др.), ферментов микробного происхождения (стрептокиназа, урокиназа, супероксиддисмутаза; различные амилазы и протеазы), полидекстранов.

Экологическая биотехнология.

Экологическое состояние окружающей среды – это постоянно нарастающая проблема для каждого государства, человеческого общества в целом. Темпы загрязнения почвы, воды и воздуха ксенобиотиками, химическими веществами, в том числе токсическими соединениями, тяжелыми металлами, пестицидами, коммунальными отходами возможно приостановить, используя биологические технологии их утилизации.

Гипотеза о «микробиологической надежности», предполагающая, что из-за повсеместного присутствия микроорганизмов в окружающей среде и их большого катаболического потенциала, любое соединение, попавшее в биосферу будет полностью минерализовано, вытекает из основополагающей роли микроорганизмов в круговороте веществ в природе. К сожалению, в реальности динамика антропогенного загрязнения окружающей среды превалирует над утилизирующими «мощностями» микроорганизмов. Если образование огромного количества жидких и твердых отходов, загазованность крупных мегаполисов, загрязнение водоемов и почв просто очевидно, то уменьшение вследствие этого биологического многообразия, оскудение генофонда в природе менее заметно, но более фундаментально по актуальности.

Поэтому основными направлениями экологической биотехнологии следует считать: расширение спектра и объема применяемых в растениеводстве, животноводстве и других отраслях биопрепаратов вместо синтетических; ремедиация окружающей среды путем активного извлечения и деструкции загрязняющих элементов (пестициды, тяжелые металлы, нефть и

нефтепродукты); утилизация ила сточных вод, твердых коммунальных отходов; нитрификация, восстановление структуры, гумуса почв, сапробности водоемов и другое путем разработки и промышленного применения безопасных для здоровья людей, животных и растений биологических технологий.

Сохранение генофонда ценных животных, растений и микроорганизмов путем применения биотехнологических подходов в восстановлении нарушенной экологии биогеоценоза.

Промышленная биотехнология.

Охватывает различные отрасли народного хозяйства. Ведущим звеном промышленной технологии (ПБ) является промышленная микробиология, так как в основе крупных биотехнологических производств лежат микробиологические процессы. Это получение в промышленных масштабах ферментов, антибиотиков, аминокислот микробного происхождения, производство в качестве инсектицидов и удобрений микробной биомассы, производство кормового белка, этанола, биогаза, витаминов, органических кислот, полисахаридов, получение белков человека, гормонов, биологически активных веществ на основе технологии рекомбинантных ДНК.

Собственно ПБ имеет место в горной металлургии. Это биогеотехнология металлов (микробиологическая гидрометаллургия, бактериальное выщелачивание металлов), позволяющая извлекать с помощью микроорганизмов и их ферментов металлы в растворимой форме из минеральных концентратов, руды. К примеру, путем превращения сульфидов металлов в растворимые сульфаты.

В нефтедобывающей отрасли находят применение микроорганизмы, расщепляющие балластный углеводород – парафин, разжижающие нефть и облегчающие ее извлечение на поверхность. Микроорганизмы – нефтедеструкторы используются для очистки загрязненных нефтепродуктами почв и водоемов.

Получение биогаза (метана) из твердых отходов также имеет реальные перспективы развития; особенно учитывая нарастающий дефицит нефтепродуктов.

Самостоятельное направление биотехнология занимает в *пищевой и легкой промышленности*: хлебопечение, сыродо-

лие, пивоварение, изготовление соков и вин; обработка текстильных изделий, выделка кожи и др.

Биоэлектроника – это использование биологических систем в качестве сенсоров, измерительно-контролирующих датчиков в сфере информационных технологий.

Наряду с *инженерной энзимологией* (получение и использование ферментов в биотехнологии) интенсивно развивается *протонженерия* (технологии изменения свойств природных белков на генетическом уровне, получение новых белков).

Иммунная биотехнология.

Развитие иммунной биотехнологии было вызвано практической необходимостью получения большого количества иммунопрепаратов для профилактики, диагностики и лечения как инфекционных, так и неинфекционных заболеваний. Иммунная биотехнология призвана на основе достижений иммунологии, микробиологии, генетической инженерии создавать и производить широкий спектр иммунных препаратов: вакцины, диагностикумы, иммунные сыворотки и моноклональные антитела.

Вакцины применяются для иммунопрофилактики, реже для лечения, поскольку они создают активный приобретенный иммунитет.

Диагностикумы необходимы для серологической диагностики заболеваний в иммуноферментном анализе, реакции связывания комплемента и других иммунологических реакциях.

Иммунные сыворотки востребованы при диагностике инфекционных заболеваний. А также они применяются с лечебной целью для создания приобретенного пассивного иммунитета.

Наиболее актуальна биотехнология в сохранении и укреплении здоровья человека; в поддержании экологического равновесия природы и ремедиации окружающей среды.

III. ОТКРЫТИЯ И РАЗРАБОТКИ, ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ

В истории развития и становления биотехнологии как научной дисциплины голландский ученый Е. Хаувинк (1984) выделил 5 периодов:

1. *Допастеровская эра* (1865). Использование спиртового и молочнокислого брожения при получении пива, вина, хлебопекарных и пивных дрожжей, сыра. Получение ферментированных продуктов и уксуса;

2. *Пастеровский период* (1866-1840 гг.) – производство этанола, бутанола, ацетона, глицерина, органических кислот, вакцин. Аэробная очистка канализационных вод. Производство кормовых дрожжей из углеводов;

3. *Период антибиотиков* (1940-1960 гг.) – производство пенициллина и других антибиотиков путем глубоинной ферментации. Культивирование растительных клеток и получение вирусных вакцин. Микробиологическая трансформация стероидов;

4. *Период управляемого биосинтеза* (1961-1975 гг.) – производство аминокислот с помощью микробных мутантов. Получение очищенных ферментных препаратов. Промышленное использование иммобилизованных ферментов и клеток. Анаэробная очистка канализационных вод и получение биогаза. Производство бактериальных полисахаридов;

5. *Эра новой биотехнологии* (с 1973 г.) – использование клеточной и генетической инженерии в целях получения агентов биосинтеза. Получение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела, гибридов из протопластов и меристемных культур. Трансплантация эмбрионов.

Допастеровская эра (до 1865 г.)

1665 г. Описана клеточная структура некоторых растительных тканей, наблюдаемая с помощью системы линз (Р. Хук)

1673 г. С помощью примитивного микроскопа увидены одноклеточные, спустя 10 лет увидены бактерии (А. Левенгук)

1769-1780 гг. Получены в чистом виде ряд органических кислот: винная, молочная, яблочная, щавелево-уксусная, лимонная, бензойная (К. Шеле)

1789 г. Получена уксусная кислота в кристаллическом виде, так называемая ледяная уксусная кислота (Т. Ловиц)

1769 г. Первая успешная вакцинация человека – вакцинация против оспы (Э. Дженнер)

1831 г. В результате наблюдения в микроскопе сделан вывод, что ядро является важной незаменимой частью клетки (Р. Браун)

1836 г. Опубликованы наблюдения, что в осадках, остающихся после брожения, содержатся частицы, способные размножаться (К. де Латур)

1838-1845 гг. Разработана теория клеток, согласно которой структурной и функциональной единицей растений и животных является клетка, которая содержит ядро (М.Я. Шлейден, Т. Шванн, Р. Вирхов)

1857 г. Доказано что спиртовое брожение происходит только в присутствии живых дрожжей. Начало микробиологии как дисциплины биологических наук (Л. Пастер)

Пастеровский период (с 1866 до 1940 г.)

1859 г. Описана материальная теория эволюции живой природы (Ч. Дарвин)

1865 г. Экспериментально обоснованы и сформулированы законы наследственности (И.Г. Мендель)

1875-1879 гг. Открыто оплодотворение яйцеклетки и слияние двух пронуклеусов (О. Гершвиц, Г. Фоле)

1875 г. Разработан метод чистых культур микроорганизмов, гарантирующий содержание в инокуляте только определенного вида микроорганизмов (Р. Кох)

1881 г. Получены первые чистые культуры грибов (О. Бефельд)

1885 г. Доказано, что клетки куриного эмбриона сохраняют жизнеспособность в солевом растворе вне тела животных – первое исследование анабиоза животных (Э.П. Ру)

1886 г. Первые комплексные исследования физиологии грибов – начало новой дисциплины – микробиологии (А. де Бари)

1887 г. Первые попытки использовать антагонизм микробов в целях защиты от инфекционных заболеваний (А. Павловский)

1888-1907 гг. Установлена фиксация атмосферного азота микроорганизмами – клубеньковыми бактериями (М. Бейерк, Х. Хелригель, Х. Вильфарт)

1893 г. Установлена способность плесневых грибов синтезировать лимонную кислоту (К. Вемер)

1894 г. Создан первый ферментный препарат, полученный из плесневого гриба, выращенного на влажном рисе (И. Такаmine)

1897 г. Установлено, что бесклеточные экстракты дрожжей способны расщеплять сахара с образованием диоксида углерода и спирта. Заложены основы энзимологии (Ф.К. Бюхнер)

1906 г. Изобретен метод хроматографии на бумаге (М.С. Цвет)

1908 г. Создана единая теория иммунитета (И.И. Мечников, П. Эрлих)

1910 г. Первое успешное применение бактериальных инсектицидов (С.М. Метальников)

1910 г. Доказана способность специфических вирусов способствовать возникновению некоторых разновидностей раковых заболеваний – сарком (П. Раус)

1911-1920 гг. Сформулирована хромосомная теория наследственности (Т.Х. Морган)

1925 г. Установлена возможность искусственного мутагеза микроорганизмов (грибов) под влиянием рентгеновского облучения (Г.А. Надсон, Г.С. Флиппович)

1926 г. Получен первый фермент в кристаллическом виде – уреазы – и доказано, что этот белок обладает каталитической активностью (Д. Самнер).

1928 г. Экспериментально доказана способность плесневых грибов синтезировать антибактериальное вещество – пенициллин (А. Флеминг)

1931 г. Создан первый просвечивающий микроскоп с использованием потока электронов (М. Кнолл, З. Руска)

1933 г. Изобретен метод качалочного культивирования микроорганизмов. С этого времени началось конструирование более сложной ферментационной аппаратуры, что дало возможность использовать в промышленности метод глубинного культивирования (А.И. Клуйвер, Л.Х. Перквин)

1933 г. Начало использования электрофореза для разделения белков в растворе (Д. Тизелиус)

1934 г. Представлена первая подробная рентгенограмма белка – кристаллов фермента пепсина (Дж. Бернал)

1936 г. Опубликована теория различных уровней сложности организации материи (Нидхем)

1938-1945 гг. Открыт процесс аэробного ресинтеза аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) (В.А. Энгельгардт)

1938 г. Создан электронный микроскоп (М. Аредн)

1939 г. Установлена способность некоторых мутантов дрожжей ассимилировать парафины и другие углеводороды. Начало использования в микробиологической промышленности нетрадиционных видов сырья (Т.А. Туссон)

Период антибиотиков (1940-1960 г.) 619229

1940 г. Разработана стабильная форма пенициллина (Флеминг, Чейз, Флори)

1942 г. Сформулировано учение об антибиотиках, введены понятие и термин «антибиотики» (С.А. Ваксман)

1944 г. Открыт стрептомицин (С.А. Ваксман)

1944 г. Установлено, что ДНК представляет генетическую информацию и переносит ее при трансформации клеток (О.Т. Эйвери, К. Мак-Леод, М. Мак-Карти)

1948 г. Открыт хлортетрациклин (Б.М. Дуггер)

1948 г. Установлен стимулирующий эффект кукурузного экстракта – первого комплексного стимулятора промышленного значения (Р.Д. Когхилл, А.И. Мойер)

1950-1960 гг. Фундаментальное исследование физиологии молочнокислых бактерий (Е.И. Квасников)

1950-1965 гг. Появление новых концепций в таксономии актиномицетов (Н.А. Красильников)

1953 г. Установлена модель двойной спирали молекулы ДНК. Расшифрован механизм действия генетического аппарата (Дж. Уотсон, Ф. Крик)

1955-1965 г. Создана теория непрерывной ферментации (И. Малек, З. Фенце)

1953 г. Обобщено микробиологическое разложение целлюлозы (А.А. Имшенецкий)

1955 г. Обнаружено, что клетки животных способны длительное время существовать и размножаться в определенной смеси низкомолекулярных соединений и комплекса белков сыворотки. Начало практического культивирования тканевых культур (Х. Игл).

1957 г. Открыт интерферон – важный фактор иммунологической системы животных и человека (А. Айсакс, И. Линдеман)

Период управляемого биосинтеза (1961-1975 гг.)

1961 г. Установлена способность мутантов бактерий к сверхсинтезу аминокислот. Начало микробного синтеза аминокислот (С. Киносита, К. Накаяма, С. Китада)

1961 г. Создана концепция энергетического сопряжения – основы мембранной биоэнергетики (О. Митчелл)

1962 г. Получены данные о существовании фермента ДНК-рестриктазы, используемой для расщепления молекулы ДНК в определенных местах (В. Абер, Г. Смит, Д. Натанс)

1968 г. Расшифрован генетический код и его функции в синтезе белков (Р. Холи, Х.Г. Корана, М. Ниренбергер)

1968 г. Синтез гена в лаборатории (Х.Г. Корана)

1969 г. Изолирован ген из генетического материала клетки (Дж Беквит, Д. Шапиро, И. Ирон)

1970 г. Открыты информасомы (А.С. Спирин, Г.П. Георгиев, Л.П. Овчинников)

1970-1980 гг. Обобщены физиолого-биохимические основы деятельности фотосинтезирующих бактерий (Е.Н. Кондратьева)

1970-1980 гг. Открыты новые пути биосинтеза полифосфатов микроорганизмами (Н.С. Кулаев)

1972 г. Разработана технология клонирования ДНК (П. Берг)

1972 г. Установлен химический состав антител – важного фактора иммунологической системы у животных (Дж. Эдельман, Р. Портер)

1975 г. Путем гибридизации соматических клеток получены гибридомы, секретирующие моноклональные антитела (Г. Келер, К. Мильштейн)

Эра новой биотехнологии (с 1973 г.)

1973 г. Создание функциональных бактериальных плазмид *in vitro* (С.Н. Козн)

1977 г. При помощи рекомбинантных бактерий получен первый гормон – соматостатин (К. Итакури, Х. Бойер)

1977-1979 гг. Химический синтез генов соматостатина и инсулина. Создание прибора – синтезатора олигонуклеотидов (фрагментов молекулы ДНК) с заданной последовательностью нуклеотидов (К. Итакури)

1977 г. Секвенирование ДНК с помощью терминирующих дидезоксинуклеотидов (Ф. Сэнгер)

1979 г. Определена первичная структура бактериородопсина – простейшего генератора электрохимического потенциала клетки (Ю. А. Овчинников)

1980 г. Полипептид, обладающий действием лейкоцитарного интерферона человека, синтезируется в *E.coli* (С. Нагата)

1981 г. Микрохирургическая трансплантация эмбрионов животных с целью быстрого размножения высокопродуктивных экземпляров (Вилландсон)

1981 г. Получение мультиплазмидных микроорганизмов, способных утилизировать несколько соединений (А.М. Чакрабарти)

1985 г. Специфическая ферментативная амплификация ДНК *in vitro*: полимеразная цепная реакция (К.К. Мюллис)

1985 г. Сформулированы новые представления о механизме регуляции биохимических реакций в клетке посредством переносчиков внешних сигналов – цАМФ (Э. Сазерленд)

1985-1988 гг. Разработаны основы бесклеточного синтеза белка в протоке (А.С. Спирин)

1989 г. Трансгенные растения табака, продуцирующие функционально активные моноклональные антитела (А. Хиатт)

1992 г. Концепция производства вакцины в трансгенных растениях (Х. Мэйсон и соавт.)

1997 г. Клонирование овцы методом переноса ядерной ДНК (К. Уилмут и др.)

Принципиальной основой деления истории биотехнологии на 5 периодов явились использовавшиеся технологии, их совершенствование с получением все более качественных биопродуктов. Но также правомерно считать основным объектом биотехнологии живые клетки, клетки микробного, растительного и животного происхождения. Поэтому далее уместно изложить историю развития отдельно, по каждому биологическому объекту, используемому в биотехнологическом производстве – микроорганизмам, растениям и животным.

1. Биотехнология микроорганизмов

Биотехнология микроорганизмов – это наука о важнейших микробиологических процессах и их практическом применении для производственного получения ценных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, их биомассы как важнейшего белкового продукта, о получении отдельных биологически активных веществ (биопрепараты, используемые в разных отраслях народного хозяйства и медицине).

Многие века человеческое общество использовало микробиологические процессы в получении кисломолочных продуктов, вина и пива, хлебопечении, не зная при этом научных основ применяемых технологий, но исходя из большого практического опыта (рис. 2).

Научные основы микробиологических процессов были открыты Л. Пастером (1822-1895 гг.), а именно было доказано в блестящих экспериментах, что брожение и гниение это не цепь химических реакций, а воздействие на субстрат различных групп микроорганизмов и что в результате микробиологического процесса – брожения в зависимости от вида микроорганизмов накапливаются органические кислоты (масляная, молочная, пропионовая и другие), спирт. Отсюда спиртовое, маслянокислое, молочнокислое, пропионовокислое брожение. М.М. Манасейн (1872) показал, что спиртовое брожение может происходить и в отсутствие живых микроорганизмов. Однако более поздние исследования ученых выявили роль микробных ферментов в бродильном процессе.

Один из типов брожения, пектиновое брожение, обусловлено деятельностью анаэробных микроорганизмов. Анаэробные бактерии в бескислородных условиях при мочке льна, конопли и других прядильных растений, разлагают имеющиеся в их составе пектиновые вещества и тем самым разрушают волокна растений, используемых в ткацком производстве.

Интенсивное исследование биологических свойств, ферментативной активности микроорганизмов все более и более раскрывало сущность микробиологических процессов в тех или иных производственных технологиях. Это получение глице-



Рис. 2. Изображение биотехнологического процесса на раскрашенном барельефе из египетской гробницы.

О том, что ферментация была известна еще в древности, наглядно свидетельствуют сцены приготовления хлеба и пива, изображенные на раскрашенном барельефе из египетской гробницы V династии, датируемой 2400 г. до н.э. Этот барельеф находится сейчас в коллекции Национального музея древностей в Лейдене. В верхнем ряду изображены люди, которые (*справа налево*) молотят, веют, и мелют зерно (скорее всего ячмень или эммер – примитивную разновидность пшеницы.) В среднем ряду (*слева*) они замачивают муку грубого помола в воде, оставляя часть целых зерен для прорастания и осоложивания. Фигуры в центре замешивают квашеное тесто и делают из него хлеба различной формы. *Справа* показана выпечка «пивного хлеба» в печи. Пекарь изображен в характерной позе: одной рукой он мешает кочергой угли в печи, а другой прикрывает глаза от жара. В нижнем ряду сусло заливают в бродильный чан, стоящий на подставке, похожей на скрученную в кольца веревку. После брожения в течение нескольких дней готовое пиво разливают в глиняные кувшины, которые немедленно закупоривают, наглухо замазывают глиной и оставляют на хранение. Первоначально процесс брожения происходил благодаря дрожжам, имеющимся в воздухе, на кожуре фруктов и поверхности зерен; позднее в Египте стали использовать чистые или почти чистые дрожжи. Древние пивовары изготавливали несколько сортов пива; некоторые из них, считавшиеся крепкими, содержали, вероятно, до 12% спирта (А. Демейн, Н. Соломон, 1984).

рина при брожении сахара и мелассы, ацетона из кукурузной муки, ацетона и бутилового спирта из сахара.

В 1923 году было запущено микробиологическое производство лимонной кислоты, позднее молочной и других органических кислот, являющихся конечным продуктом процесса брожения.

В лабораторных условиях была выявлена способность микроорганизмов участвовать в очистке сточных вод от нефтепродуктов, в получении белков при культивировании микроорганизмов на средах, содержащих углеводороды нефти.

Разработаны технологии получения метаболитов микроорганизмов – рибофлавина (1935) и витамина B₁₂ (1948).

Производство антибиотиков относится к самой весомой составляющей микробиологического производства. В настоящее время несколько сотен антибиотиков (основные продуценты – актиномицеты, плесневые грибы, бактерии) широко применяются в животноводстве, ветеринарии, растениеводстве и особенно они востребованы в медицине. К примеру, пенициллин, продуцируемый плесневыми грибами. Вначале было открытие

антагонистической активности плесени к гноеродным коккам (А. Флеминг, 1929), затем получение химически стабильной формы препарата и уже в 1941 году, в годы Великой отечественной войны начато крупномасштабное производство пенициллина. Селекционированный учеными штамм плесневого гриба в несколько тысяч раз больше продуцировал пенициллин, нежели исходные культуры грибов.

Завидные успехи селекции, целенаправленного отбора промышленно-ценных микроорганизмов, несмотря на сравнительно позднее познание учеными физиологии микромира (в отличие от селекции культур растений и сельскохозяйственных животных, имеющих тысячелетнюю историю), связаны с быстрой сменой поколений в микробной популяции, не сложной организацией и управляемостью метаболических процессов в клетках прокариот.

Микробиологическое производство включает и культивирование зеленых водорослей, накопление их биомассы в присутствии света и воды (фотосинтез). К примеру, зеленую водоросль *Spirulina maxima*, *Sp. platensis* мексиканцы употребляли в пищу в форме высушенных брикетов. Зеленая водоросль довольно быстро размножается при обилии света в теплых водоемах. При биохимическом анализе было выявлено, что сухая масса микроводоросли содержит до 70% белка. В 50-70-е годы прошедшего столетия были запущены небольшие фабрики по производству муки из *Spirulina sp.* (до 500-1000 тонн муки в год) в Японии, Италии, Израиле. В Узбекистане в 1980-е годы в водоемах выращивали зеленые водоросли как корм для крупного рогатого скота, как удобрение для хлопка.

В Казахстане (г. Степногорск) в 1970-80-е годы на базе научно-производственного комплекса «Прогресс» было налажено крупнотоннажное микробиологическое производство аминокислоты лизина, кормовых белков, ферментов (амилосубтилин и глюкамоварин) для спиртового производства, антибиотиков (тилозин и менонзин) для повышения упитанности и устойчивости к болезням молодняка сельскохозяйственных животных (рис.3).

На Алматинском биокомбинате производились в промышленных масштабах вакцины и диагностические биопрепараты для ветеринарии (рис. 4).

Очевидна взаимосвязь, определенная зависимость объема и качества микробиологической продукции (аминокислоты, ферменты, белки, антибиотики, витамины и др.) от совершенности технологического процесса, от биопroduцирующей активности, «технологичности» штамма микроорганизмов.

Хранение, поддержание жизнеспособности, паспортизация и депонирование промышленных микроорганизмов обеспечиваются коллекциями культур микроорганизмов. Сохранение и постоянное расширение микробиологических ресурсов – это необходимое, начальное звено в цепи микробиологического, биотехнологического производства. Наличие качественных штаммов микроорганизмов – сверхпродуцентов в определенной степени обеспечивает рациональность производства.

Исследования в области молекулярной биологии, генетики микроорганизмов внесли качественно иной подход к разработке штаммов-продуцентов, используемых в биотехнологическом производстве. Это технология рекомбинантных ДНК.



Рис. 3. Микробиологическое производство аминокислоты лизина, НПО «Прогресс».



Рис. 4. Производство вакцин, диагностических биопрепаратов на Алматинском биокombинате.

Последовательность событий следующая. В экспериментах с капсульными и бескапсульными штаммами пневмококков О.Т Эйверн, Мак-Леод, М. Мак-Карти (1944) установили, что носителем генетической информации является ДНК, крупные фрагменты которой могут быть трансформированы в гомологичные культуры пневмококков. В 1946 году Ледерберг и Татум показали, что между разными штаммами кишечной палочки может происходить обмен фрагментами хромосомной ДНК с появлением дочерних клеток, отличающихся от исходных культур микроорганизмов новой генетической комбинацией (генетическая рекомбинация).

В последующем, используя в опытах два фермента (рестриктазу – в определенных сайтах разрезает молекулу ДНК; лигазу – сшивает фрагменты ДНК) был показан путь создания специфической рекомбинантной молекулы ДНК *in vitro*.

Конечно же плодотворные исследования по получению рекомбинантных молекул ДНК стали возможны благодаря расшифровке механизма действия генетического аппарата, установления модели двойной спирали ДНК. Дж. Уотсон и Ф. Крик (1953) писали по результатам выполненных ими работ – «мы хотим предложить структуру соли дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Эта структура обладает весьма необычными свойствами и представляет большой интерес... Она образована двумя спиральными цепочками, закрученными вокруг общей оси... Обе спирали правые..., но... последовательности атомов в них взаимно противоположны... Весьма интересен способ, с помощью которого цепочки удерживаются вместе... Пуриновые и пиримидиновые основания образуют пары, при этом пуриновые основания одной цепи соединены водородными связями с пиримидиновыми основаниями другой... Если одно из оснований пары – это аденин, то... вторым основанием должен быть тимин; то же самое относится к гуанину и цитозину. Последовательность оснований в полинуклеотидной цепи может быть любой. Очень важно, что из предложенного нами механизма специфического спаривания непосредственно вытекает возможность копирования генетического материала». Далее

они поясняют – «Сахарофосфатный эстов в нашей модели абсолютно постоянен, но в эту структуру может вписаться любая последовательность пар нуклеотидов. В длинной молекуле возможно безграничное число перестановок, и нам кажется вполне вероятным, что точная последовательность оснований содержит в закодированном виде генетическую информацию... Наша модель дает объяснение многим феноменам. Например, спонтанная мутация может возникнуть в результате случайного перехода одного из оснований в редкую таутомерную форму, а образование пар гомологичных хромосом при мейозе может обусловить специфическое спаривание оснований».

В 1973 году С. Коэн и Г. Бойер с сотрудниками разработали метод передачи единицы наследственности (гена) от донора к реципиенту, разработали технологию получения рекомбинантных ДНК. Они писали, «...есть надежда, что удастся ввести в *E.coli* (бактериальную клетку) гены, ассоциированные с метаболическими и синтетическими функциями, присущими другим биологическим видам, например, гены фотосинтеза или продукции антибиотиков».

Технология рекомбинантных ДНК дает возможность получать в большом количестве ценные биологические активные вещества (инсулин, интерлейкин, интерферон, соматотропин и др.) путем создания новых генетических конструкций на основе микробных, растительных либо животных клеток. Технология рекомбинантных ДНК дополняет классический селекционный метод разработки сверхпродуцентов, выводит на более оперативный путь получения биотехнологической продукции, используя генетически модифицированные штаммы промышленных микроорганизмов.

2. Биотехнология растений

Биотехнология растений – это наука, направленная на получение новых продуктивных сортов и линий, биологически активных соединений растительного происхождения.

Хозяйственно – ценные сорта растений (пшеница, кукуруза, рис, соя, картофель) во все времена были в центре внимания селекционеров. Повышение урожайности сельскохозяйственных культур, их устойчивости к неблагоприятным климатическим факторам, болезням остается и сегодня актуальной проблемой в экономике каждого государства. Не является исключением и Казахстан. В его северных областях большие площади засеваются зерновыми культурами, южные – хлопком и рисом, почти во всех регионах есть картофелеводство.

Благодаря применению интенсивного метода в растениеводстве в 50-60-е годы XX века в экономически развитых странах урожайность зерновых культур выросла в 2-3 раза. Были внедрены короткостебельные сорта с повышенной устойчивостью к болезням, вредителям, отзывчивые на факторы интенсификации земледелия. Использованы новые технологии в семеноводстве, направленные на повышение качества семян, их подготовке к посевному периоду и т.д.

В 60-х годах прошлого столетия появилось выражение – «зеленая революция», когда не только в развитых странах, но и в Мексике, на Филиппинах и в других развивающихся государствах интенсивная технология позволила значительно увеличить производство пшеницы и риса.

Наряду с традиционной селекционной работой параллельно проводились исследования с изолированными тканями растительного организма, ставились опыты по выращиванию целого растения из черенка, из клона (*klon* – черенок или побег, пригодный для размножения растения; Уэббер, 1903). В период с 1892 по 1902 годы немецкие исследователи Хаберландт, Фехтинг и Рехингер получили первичный каллус, помещая в раствор сахарозы кусочки стеблей одуванчика, тополя. Но были тщетны усилия вырастить из каллуса целое растение. Работы в этом направлении продолжались учеными – селекционерами во мно-

гих странах. Основанием для подобных исследований являлась гипотеза о тотипотентности растительных клеток, т.е. способности этих клеток при определенных условиях культивирования давать начало образованию целого растения.

Успешность регенерации зависит от состава питательных сред и условий культивирования. В 1930 году американский исследователь Робинс и немецкий ученый Коте показали возможность культивирования на твердых питательных средах меристем кончиков корня томата и кукурузы. Однако через определенное время растительные ткани бурели и погибали. Француз Готре смог длительное время культивировать растительную ткань *in vitro* путем периодической замены используемой питательной среды на свежую. И только в 50-е годы прошлого столетия ученый Ж. Морей путем клонального микроразмножения впервые вырастил целое растение – орхидею из апикальной меристемы *in vitro*.

Апикальная меристема (небольшой участок не более 0,1 мм, расположенный на кончике стебля и состоящий из недифференцированных клеток; участок постоянно растет и образует органы растения), практически не содержит вирусов, поэтому путем размножения меристем можно получать здоровые, безвирусные растения. Клетки меристемы делятся и она образует маленькое растение с 5-6 листочками. Вырастающий за несколько недель стебель разрезают на 5-6 микрочеренков, которые при благоприятных условиях вырастают в нормальное растение. Для каждого вида растения, размножаемого таким способом подбор условий требует нескольких лет работы.

Успехи развития биотехнологии растений во многом связаны с открытием фитогормонов – биологически активных веществ, оказывающих регулирующее воздействие на рост и размножение растения. Исследования фитогормонов были начаты в 20-е годы прошлого столетия. Немецкий ученый Ф. Кегель выделил в чистом виде одну из групп гормональных веществ – ауксины, а именно индолил-триуксусную кислоту (ИУК). Он показал, что образуется ИУК в апикальных меристемах стебля и регулирует растяжение, деление и дифференцировку растительной клетки.

Другая группа фитогормонов – гиббереллины открыты в 1926 году и выделены в химически чистом виде в 1938 году в Японии. Они вызывают активный рост стебля, не влияя на рост листа и угнетая рост корней; повышают активность меристематических тканей.

В 50-е годы прошедшего столетия была открыта еще одна группа фитогормонов – цитокинины. Они стимулируют деление растительных клеток, синтезируются в апикальных меристемах корня. В отличие от ауксинов, создающих необходимые условия для инициации митоза (дедифференцировка и репликация ДНК) цитокинины активируют последующие стадии клеточного деления (работу РНК-полимераз, образование РНК и синтез белков; регулируют органогенез). Цитокинины не только задерживают старение листьев, сохраняя их зеленый цвет, но и регулируют формирование хлоропластов на ранних стадиях развития листа, а также их рост и деление за счет стимуляции синтеза хлоропластных РНК и белков. Они повышают устойчивость растений к абиотическим факторам: к повреждающему действию температуры, недостатку влаги, засоленности почвы и др.

Были выделены и изучены фитогормоны, обладающие ингибиторным действием. К примеру, абсцизовая кислота впервые была выделена из молодых коробочек хлопчатника. Этот фитогормон обладает мощным ретардантным (тормозящим вегетативный рост) эффектом – ускоряет распад нуклеиновых кислот, белков, хлорофилла.

Естественно, фитогормоны стали успешно применяться в селекции, микроклональном размножении растений, в регуляции органогенеза. Так, предварительная обработка черенков ауксином перед посадкой на укоренение усиливает процесс корнеобразования. Ф. Скуг и К. Миллер впервые обнаружили способность фитогормонов регулировать органогенез у недифференцированной ткани каллуса табака. Они с помощью ауксина и цитокинина вызывали образование у каллусов корней и побегов.

Наряду с фитогормонами, регулирующими рост и размножение растения были открыты адаптогены, определяющие рези-

стентность организма растения к неблагоприятным абиотическим и биотическим факторам окружающей среды. К примеру, мивал, обладающий антиоксидантным действием (стабилизирует клеточные мембраны, упрочняет белково-липидные связи и усиливает структурную прочность клеточных мембран), крезозин, стимулирующий синтез витамина Е. Другой адаптоген этилен стимулирует синтез растениями фитоалексинов, обладающих антибиотической активностью, а также усиливает действие фермента хитиназы, разрушающей хитин пищеварительного тракта у насекомых и хитиноподобное вещество клеточной стенки фитопатогенных грибов.

В настоящее время совместное применение методологии микроклонального размножения и фитогормонов с адаптогенами является оптимальным путем получения ценных культур растений. Почти все цветочные культуры, распространенные во Франции получены подобной технологией. Посадочный материал плодовых, декоративных, овощных культур получают технологией микроклонального размножения в десятках питомников в США. Основным производителем безвирусных цветочных растений, в том числе роз, остается Голландия, а Италия первенствует по подвоям яблони, сливы и персиков. Сохранение и расширение генофонда растений в питомниках, криоконсервация соматических клеток растений в жидком азоте (-196°C) – является базой для успешного развития биотехнологии растений, обеспечения научных и производственных предприятий уникальными сортами и линиями.

Еще одно направление в истории развития биотехнологии растений – это использование изолированных протопластов, полученных из корней и плодов, их слияние *in vitro*, создание соматических гибридов. Изолированные протопласты были получены в 1960 году ферментативным методом в больших количествах. Последующее слияние протопластов позволило увеличить число и разнообразие гибридов без применения полового размножения. Однако при культивировании изолированных клеток и тканей *in vitro* в основном используется каллусная ткань, а изолированные клеточные суспензии и

протопласты более востребованы в фундаментальных научных исследованиях.

Методология биотехнологии растений коренным образом изменилась в связи с открытием технологии рекомбинантной ДНК. Генетическая инженерия позволила получать трансгенные растения, устойчивые к вирусным инфекциям, гербицидам, с измененным сроком созревания ягод и плодов, с измененной окраской цветков, повышенной пищевой ценностью семян и др.

Для получения трансгенного растения, как и модифицированного микроорганизма нужна эффективная векторная система (чаще это плазмиды или бактериофаги). Учеными в качестве вектора была использована плазида *Agrobacterium tumefaciens* (это бактерия – фитопатоген, которая в процессе своего жизненного цикла трансформирует клетки растений, благодаря способности ее плазмиды проникать в растительные клетки и интегрировать в их геном (Н. De Jreve et al., 1982). По результатам выполнения исследований ученые писали: «Для получения трансгенных растений необходима эффективная векторная система. Первые попытки создания таких систем основывались на использовании Ti – плазмиды (tumor – inducing plasmid) почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens*, поскольку после инфицирования чувствительных двудольных растений часть Ti – плазмиды (Т-ДНК) встраивается непосредственно в хромосомную ДНК клетки растения – реципиента. Однако при инфицировании растений Ti – плазмидой на трансформированных растениях образуется корончатый галл – опухоль, препятствующая нормальному росту растения. Поэтому, прежде чем использовать Ti – плазмиду в качестве вектора для трансформации растений, необходимо предотвратить образование опухоли. Изучая мРНК, транскрибируемые с интактных и модифицированных Т-ДНК было показано, что гены, ответственные за развитие корончатого галла локализованы в Т-ДНК. Это означало, что можно удалить из Т-ДНК эти гены и ввести ее с помощью гомологичной рекомбинации в Ti – плазмиду, а последнюю – в растительные клетки. Ti – плазида, включившись в хромосомную ДНК обычным способом, пере-

несет и свою Т-ДНК, которая теперь не несет генов корончатого галла. Следующим логическим шагом в развитии этой системы стало клонирование чужеродного маркерного гена и гена интересующего исследователя в Т-ДНК, чтобы их можно было транспортировать в хромосомную ДНК растения-хозяина. Векторная система на основе Ti – плазмид нашла широкое применение во всем мире. Ее используют для создания трансгенных растений в тысячах лабораторий. В результате внедрения генно-инженерной технологии в растениеводстве получены устойчивые к гербицидам и насекомым – соя, сахарная свекла, картофель, кукуруза, хлопчатник, томаты; к колорадскому жуку и фитопатогенам – картофель; к засолению, ржавчине и фузариозу колоса – пшеница и др. Общая посевная площадь занимаемая трансгенными растениями в мире превышает 50 млн. гектаров, причем более 80% занимают соя и кукуруза.

3. Биотехнология животных организмов, клеток и тканей

Биотехнология животных организмов, клеток и тканей является интенсивно развивающимся направлением современной биотехнологии, успехи которой напрямую связаны с развитием генной инженерии и молекулярной биологии.

Известно, что рациональное ведение домашнего хозяйства основывалось на отборе здоровых и выбраковке больных животных и птиц, защите их от хищников и болезней. Развитие животноводческого производства сопровождалось организацией птицефабрик, овец – и свиней ферм, коневодческих хозяйств, племенных заводов и др. В этот период биологическая технология основывалась на принципах естественного отбора и заключалась в формировании поголовья мясомолочных пород крупного рогатого скота, тонкорунных и курдючных овец, яйценоских птиц и т.п. Для профилактики инфекционных болезней стали широко применяться вакцины-биопрепараты микробного происхождения. Рутинной технологией стало осеменение, особенно крупного рогатого скота, заготовленным криоконсервацией спермием самцов – производителей.

Новый этап развития биотехнологии в животноводстве обусловлен успехами эндокринологии, с открытием ряда гормонов, регулирующих процесс воспроизводства. Так, открытие гормонов гипофиза (фолликулостимулирующий гормон, лютеинизирующий гормон, пролактин), оказало стимулирующее и регуляторное действие на половые железы. Далее знания о роли гипоталамуса в регуляции деятельности гипофизарных гормонов, о гонадотронин – рилизинг гормоне (ГН - РГ), о простогландах в совокупности дали возможность оптимизировать воспроизводство сельско – хозяйственных животных путем активной регуляции полового цикла, синхронизации сроков искусственного осеменения. Наряду с трансплантацией спермиев от самцов – производителей для улучшения разведения, отбора более продуктивных особей разрабатываются методы трансплантации эмбрионов от высокопородистых самок к менее породистым животным для вынашивания плода и вскармливания потомства, тем самым освобождая генетически ценную особь от этого процесса и ускоряя сроки, периодичность искусственного оплодотворения и получения от нее эмбрионов.

Разработаны методы экспериментальной биотехнологии воспроизводства лабораторных животных путем оплодотворения яйцеклеток *in vitro*.

Интенсивно выполняются работы по клонированию животных. В 1977 году клонирована овечка Долли с использованием ядер соматических клеток. Вместо пересадки ядер тотипотентных клеток из эмбрионов, как ранее практиковалось, в данном случае в энуклеированные яйцеклетки были пересажены ядра соматических клеток.

Параллельно с развитием биотехнологии воспроизводства животного организма усиленно разрабатываются технологии клеточной и генетической инженерии на основе животных клеток.

Одним из методов клеточной инженерии является гибридизация соматических клеток, или слияние двух соматических клеток, при котором осуществляется перенос генов. Если две линии клеток инкубировать вместе в присутствии полиэтиленгликоля слияние клеток приведет к слиянию ядер, т.е. слиянию

хромосом родительских клеток. Возникающие гибриды отделяются на селективных средах.

Самостоятельный период в развитии клеточной технологии – это разработка гибридных технологий, получение моноклональных антител. В 1960 году вирусолог Бареки и сотр. обнаружили, что при совместном культивировании двух линий опухолевых клеток лабораторных мышей образуется новый тип клеток. По морфологическим признакам и особенностям роста эти клетки отличались от родительских. В 1964 году исследователь Эфрусси провел слияние не опухолевых, а соматических, дифференцированных клеток мышей, но с очень низкой частотой слияния (10^{-4} - 10^{-6}). В последующем увеличение частоты слияния было достигнуто при внесении в смесь инкубированных клеток жизнеспособных или инактивированных вирусов либо химических соединений (к примеру, вышеприведенный полиэтиленгликоль).

В результате иммунного ответа на микробные антигены, чужеродные белки и другие иммуногенные соединения в сыворотке крови человека, животных нарастает титр различной специфичности антител, вырабатываемых разными линиями В-лимфоцитов. Учитывая то, что В-лимфоциты одной линии продуцируют антитела одной специфичности исследователи пытались *in vitro* из сыворотки иммунизированного животного отделить одну линию В-лимфоцитов и культивировать ее, чтобы получать антитела одной специфичности, т.е. моноклональные антитела, взаимодействующие только с одним, комплементарным антигеном, но В-лимфоциты погибали *in vitro*, не культивировались.

Тогда ученые Милстайн и Келер получили гибридную клетку путем слияния соматической, недифференцированной, постоянно растущей опухолевой клетки миеломы и другой соматической, дифференцированной, не растущей *in vitro* клеткой – В-лимфоцитом. Гибридома характеризовалась безудержным ростом и размножением с одновременной продукцией антител одной специфичности – моноклональных антител. Последние широко применяются в медицине, биологии, биотехнологии и других отраслях.

Естественно, гибридную технологию можно выделить отдельным периодом в биотехнологии животных клеток потому, что эта работа в значительной степени являлась результатом синтеза исследований ученых в области антителопродукции, культивирования животных клеток *in vitro*, гибридизации соматических клеток, проводившихся в течении двух десятилетий. Основы использования клеток человека и животных в биотехнологии были заложены еще в 1949 году, когда группе американских ученых (Эндерс, Уэллер, Робинс) удалось вырастить вирус полиомиелита в культивируемых клетках кожи и мышц человеческого зародыша *in vitro*.

Не менее актуально для современной биотехнологии исследование стволовых клеток в качестве биологических объектов, используемых в медицине. Эти клетки способны самоподдерживаться в организме человека и животных длительное время. Они необходимы организму в любом месте, где возникает потребность в новых высокоспециализированных (дифференцированных) клетках, которые, как правило, утрачивают способность пролиферировать.

Стволовые клетки характеризуются способностью к неограниченному делению – самообновлению и детерминированию (наличие внутренних отличий, определяющих особенности их дифференциации). Впервые эмбриональные стволовые клетки были выделены у лабораторных мышей в 1981 году. В последующем были отработаны методы задержки *in vitro* процесса дифференциации стволовых клеток (к примеру, внося в суспензию стволовых клеток полипептиды, выделенные из печеночных клеток лабораторных крыс).

Технология рекомбинантных ДНК с использованием клеток человека и животных, технология получения трансгенных животных весьма актуальна и проблематична для общества, как и трансгенные растения. Разработаны следующие методы создания трансгенных животных: микроинъекции аликвоты донорной ДНК при помощи микропипеток в пронуклеус; ретровирусная трансфекция эмбрионов; использование трансгенной спермы в качестве вектора и получение эмбриональных химер с помощью эмбриональных стволовых клеток.

Способность рекомбинантной ДНК проникать в эукариотные клетки называется трансфекцией. Последующая интеграция чужеродной ДНК с клеточной хромосомой является основой генетической трансформации, воспроизводства трансгенного животного. Выращенные в лабораторных условиях трансгенные овцы, коровы, свиньи, кролики продуцируют детерминированные чужеродным генетическим материалом различные биологически активные соединения, прежде всего, белки (интерлейкин, интерферон, эритропоэтин, моноклональные антитела, фактор свертывания крови и др.) с молоком (молочная железа – «биореактор»).

Вместе с тем по данным американских исследователей (Pursel и др., 1990) положительное влияние трансфицированного гена гормона роста на трансгенных свиней, включая ускоренный рост, повышение эффективности использования корма и снижение содержания жира в туше, у некоторых животных сопровождается хромотой и язвой желудка, иногда нарушением метаболизма глюкозы.

Таким образом, история традиционной биотехнологии, рассмотренная по каждому биологическому объекту отдельно – микробной, растительной и животной клетке смыкается на технологии рекомбинантной ДНК – нетрадиционной биотехнологии. Модифицированные микроорганизмы, трансгенные растения и животные – это дальнейшая история развития биологической науки, в том числе биотехнологии.

Развитие биотехнологии в Казахстане

В 1993 году Указом Президента Республики Казахстан был организован Национальный центр биотехнологии (НЦБ). В структуру НЦБ вошли: научно-производственный комплекс «Прогресс» (г. Степногорск), Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина (г. Алматы), Институт микробиологии и вирусологии (г. Алматы), Алматинский биокомбинат, Научно-исследовательский сельскохозяйственный институт (пгт. Гвардейский Жамбылской области, ныне Научно-иссле-

довательский институт проблем биобезопасности), затем вновь созданный Институт физиологии, генетики и биоинженерии растений (г. Алматы, ныне Институт биологии и биотехнологии растений) и Республиканская коллекция микроорганизмов (г. Астана).

На научно-производственном комплексе «Прогресс» было налажено крупнотоннажное производство биопрепаратов, востребованных в сельском хозяйстве и животноводстве. Здесь выпускали аминокислоту лизин, используемую в качестве кормовой добавки; востребованные в пищевой промышленности ферменты-амилосубтилин и глюкамоварин; инсектицидные препараты-бактоларвицид и лепидоцид.

Алматинский биокомбинат, Научно-исследовательский сельскохозяйственный институт производят диагностикумы, иммунные сыворотки и вакцины для исследования и профилактики антропоозоонозных инфекций вирусной и бактериальной этиологии.

Институт промышленной биотехнологии (г. Степногорск), организованный на базе центральной заводской лаборатории НПО «Прогресс» занимается отработкой технологий, опытно-промышленным производством новых биопрепаратов. В институте выпускается пробиотик «Бифидумбактерин сухой», протеолитический фермент «Феррим», закваски для сметаны и другие препараты.

Институт микробиологии и вирусологии, кафедра микробиологии Казахского национального университета им. аль-Фараби многие годы занимаются разработкой промышленных микроорганизмов. Были селекционированы штаммы продуценты противогрибкового антибиотика розеофуни ин. Разработан пробиотический консорциум на основе лактобацилл и бифидобактерий с добавлением сухого экстракта топинамбура. Исследованы микроорганизмы, обладающие способностью сорбировать тяжелые металлы (ртуть, свинец, кадмий и др.), загрязняющие почву и водоемы. Выделены и изучены культуры дрожжей и молочнокислых бактерий, обладающие пробиотическими свойствами, из нефтезагрязненных регионов Казахстана селекционированы

штаммы псевдомонад и бацилл, активно расщепляющие компоненты нефти и нефтепродуктов.

В Институте физиологии, генетики и биоинженерии растений разработана технология ускоренной селекции пшеницы и ячменя, исследуется роль фитогормонов в процессе онтогенеза растительного организма; создан первый отечественный длиннозерный сорт риса «Алтынай».

В Институте молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина методами стабильной генетической трансформации и регенерации получены трансгенный картофель, устойчивый к вирусной инфекции, трансгенная кукуруза устойчивая к низким температурам окружающей среды, трансгенный табак, устойчивый к гербициду фосфинотридину.

Республиканская коллекция микроорганизмов ответственна за сохранение и расширение ресурсов промышленных микроорганизмов, необходимых для биотехнологического производства.

В лабораториях НЦБ разработана технология моноклональных антител, используемых при изготовлении диагностических иммуно-ферментных тест-систем, получены линии пшеницы, устойчивые к фитопатогенам, засолению почвы.

Необходимо отметить, что научные исследования и прикладные работы по биотехнологии проводятся в ряде институтов и предприятий Министерства сельского хозяйства, Министерства охраны окружающей среды, Министерства здравоохранения; а также негосударственными предприятиями.

В 2005 году постановлением Правительства Республики Казахстан утверждена Концепция развития Национального центра биотехнологии Республики Казахстан, нацеленная на формирование конкурентоспособного, отвечающего самым высоким мировым стандартам научно-исследовательского учреждения в сфере биотехнологии. Начато оснащение институтов высокотехнологичным современным оборудованием, десятки молодых специалистов направлены на стажировку в ведущие научные центры США, Японии, Европы и России. Начато строительство новых лабораторных корпусов РГП «НЦБ РК» на левобережье г. Астаны.

IV. ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ – БИОПРОДУЦЕНТЫ

К объектам научных исследований и технологических разработок в биотехнологии относятся микроорганизмы, клетки и ткани животных и растений. Изучение физиологии, метаболизма клеток, их генетики, разработка способов культивирования в лабораторных условиях, наработка их биомассы в промышленных объемах, выделение и очистка клеточных метаболитов преследуют одну цель в биотехнологии – эта разработка штамма микроорганизма, культуры клеток и тканей животных и растений, продуцирующих полезные для человеческой деятельности продукты. При этом от качественных характеристик биологического объекта в конечном итоге зависит ценность биопродукта. Поэтому исследования биологических свойств, селекция и отбор, генетическое модифицирование микроорганизмов – продуцентов, получение трансгенных животных и растений, по – сути, являются основополагающим звеном в биотехнологическом процессе, началом биологических технологий.

1. Промышленные микроорганизмы и ферменты

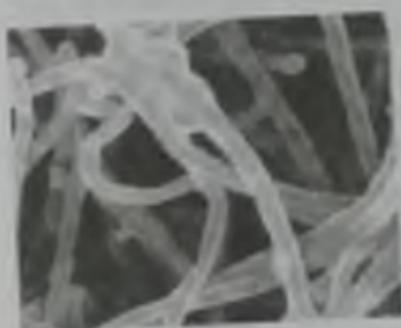
Микроорганизмы, обитающие в почве и воде, населяющие организм человека и животных, ризосферу и ткани растений участвуют в круговороте веществ в природе, продуцируют биологически активные соединения, выполняют иммунопротекторную функцию в животном организме и др. Таксономического деления микроорганизмов на промышленные и непромышленные не существует. В то же время список микроорганизмов, относящихся к промышленно-ценным с каждым годом увеличивается, пополняется как селекционированными, так и генетически модифицированными микроорганизмами. Промышленные микроорганизмы – это в основном актиномицеты и бактерии, мицелиальные грибы и дрожжи (рис. 5-8). Некоторые исследователи выделяют ферменты как самостоятельный биологический агент, востребованный в биотехнологическом производстве.



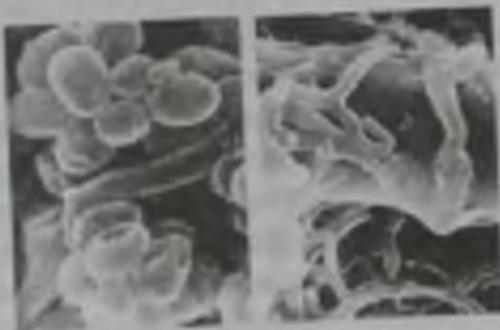
А



А



Б



Б

Рис. 5. Молочнокислые бактерии, *Lactobacillus plantarum* (А) и гифы плесени, *Aspergillus niger* (Б).

Рис. 6. Высушенные конидиоспоры *Aspergillus niger* (А) и споры и гифы микрогрибца *Trichoderma lignorum* (Б).

(М.Е. Бекер и др., 1990)

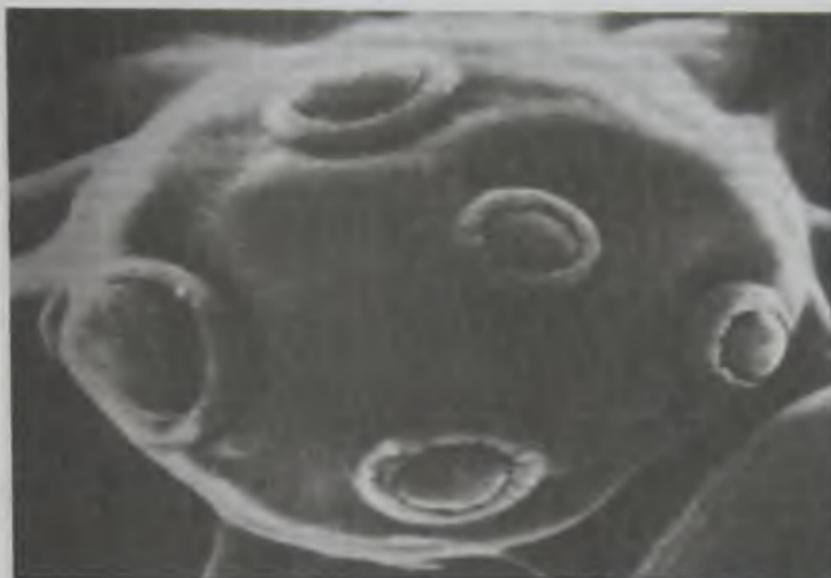


Рис. 7. Клетка дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Дрожжи могут размножаться как бесполом путем (почкованием), так и половым. Выпячивания на поверхности клетки представляют собой шрамы, оставшиеся после отделения почек. (Микрофотография получена с помощью сканирующего микроскопа Мартином У. Миллером из Калифорнийского университета в Дэвисе; $\times 12500$), (М.Е. Бекер и др., 1990).

Среди промышленных микроорганизмов широко известны такие продуценты, как *Blakeslea trispora* (провитамин А – бета-каротин), *Eremothecium ashbyi* (витамин B_{12} -рибофлавин), *Streptococcus fradiae* (антибиотик тилозин), *B. subtilis* и *B. licheniformis* (кормовой антибиотик бацитрацин), *Saccharomyces cerevisiae* (пекарские дрожжи, вино, пиво, спирт), *Streptomyces spp.* (антибиотики – аминогликозиды, макролиды, тетрациклины, β -лактамы), *Lactobacillus spp.* (айран, кефир, йогурт и др.), *Propionibacterium shermanii* (швейцарский сыр), *Penicillium spp.* (пенициллины, сыры), *Corynebacterium glutamicum* (аминокислота – лизин), *Bacillus spp.* (антибиотики – грамицидин, полимиксин, бацитрацин; протеолитические ферменты; биоинсектициды). Этот список включает сотни микроорганизмов – продуцентов. Выбор для разработки промышленно-ценных микроорганизмов осуществляется из сотен тысяч микроорганизмов

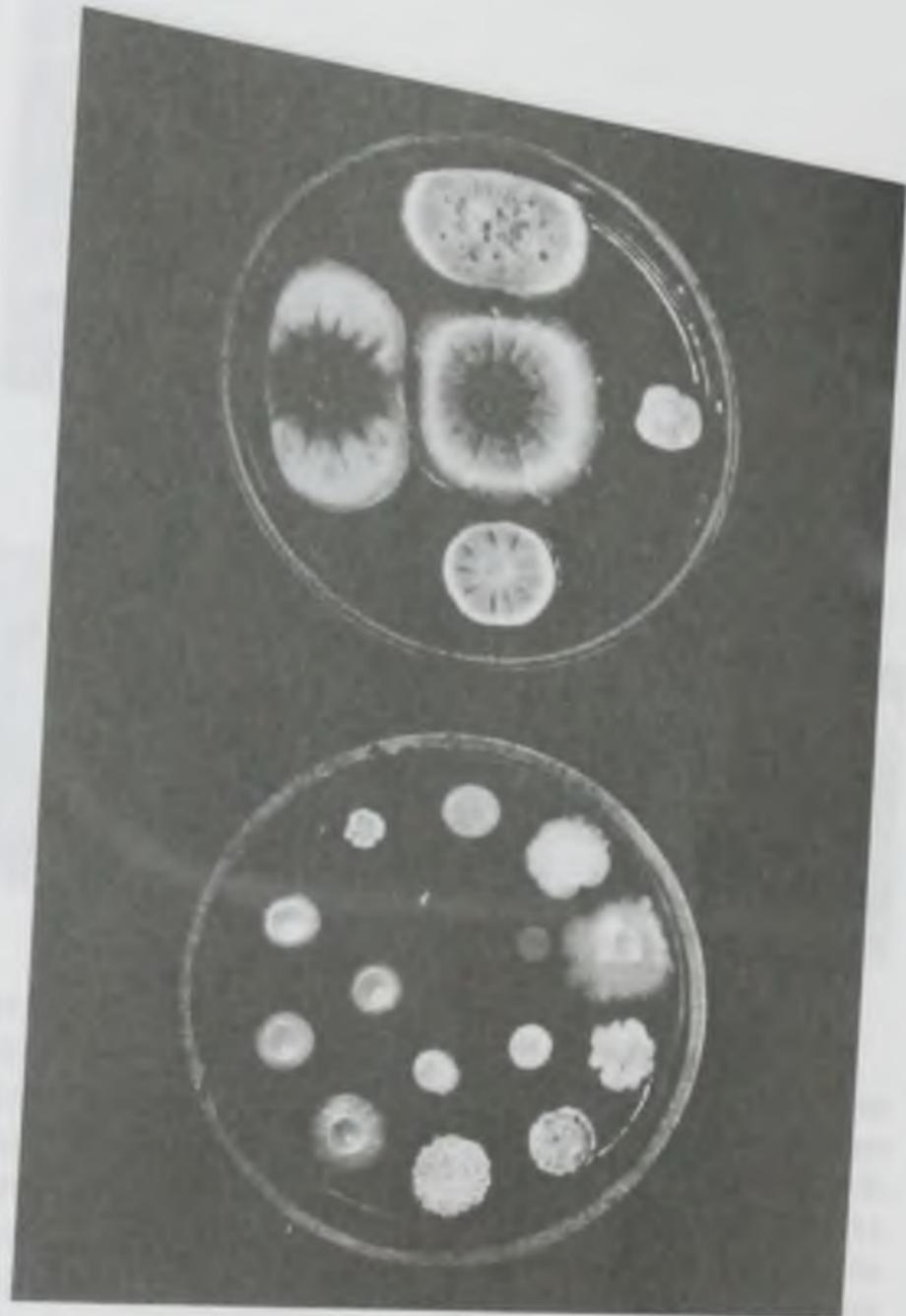


Рис. 8. Плесени и дрожжи – это микроорганизмы, образующие при выращивании на свету или на соответствующей среде видимые невооруженным глазом и часто окрашенные структуры.

Показаны чистые культуры некоторых плесеней (*вверху*) и дрожжей (*внизу*). Они способны производить промышленно важные продукты. В том числе лимонную кислоту, ферменты, антибиотики, sake, соевый соус и микробный белок.

мов, населяющих окружающую среду, организм человека, животных и растений.

Промышленные микроорганизмы подразделяют по продуцируемым ими первичным и вторичным метаболитам. К первичным метаболитам относят аминокислоты, витамины, нуклеотиды, органические кислоты, ферменты и другие биологически активные вещества. Вторичные метаболиты – это антибиотики, олигопептиды и др.

Среди промышленных микроорганизмов выделяют:

- природные штаммы, полученные путем селекции;
- штаммы, измененные в результате индуцированных мутаций, усиливающих необходимые полезные свойства;
- генетически модифицированные микроорганизмы.

Промышленные микроорганизмы по своим биологическим характеристикам, метаболизму мало чем отличаются от остальных микроорганизмов. Физиологическая активность, метаболизм микроорганизмов нацелены на воспроизводство, на рост и размножение с интенсивностью, зависящей от абиотических и биотических факторов окружающей среды. Иначе говоря, любая микробная клетка представляет собой минифабрику, работающую с большой производительностью и по заданной генетической программе.

Вместе с тем промышленные группы микроорганизмов характеризуются следующими критериями (А. Воробьев, 1987):

- расти на дешевых и доступных субстратах;
- обладать высокой скоростью роста биомассы и давать высокую продуктивность целевого продукта при экономичности потребляемого питательного субстрата;
- быть генетически однородным, стабильным в отношении продуктивности и требовательности к питательному субстрату и условиям культивирования;
- быть устойчивыми к бактериофагам и другой посторонней микрофлоре;
- быть безвредными для людей и для окружающей среды;
- желательно, чтобы продуценты были термофильными и ацидофильными (или алкалофильными), так как в этом случае

легче предохранить ферментируемый субстрат от инвазии посторонней микрофлорой;

– целевой продукт биосинтеза должен иметь экономическую и хозяйственную ценность, должен легко отделяться от утилизированного субстрата.

Конечно же, главным свойством промышленно-ценного штамма, отличающего его от других микроорганизмов является сверхсинтез конечного продукта. По этому критерию промышленные штаммы должны превосходить микроорганизмы соответствующего вида в сотни и тысячи раз. Сверхсинтез целевого продукта достигается путем направленного изменения метаболических процессов клетки, используя для этого в качестве биологического объекта либо природные, либо генетически модифицированные микроорганизмы. Благодаря увеличению выхода искомого метаболита и изменению некоторых биологических свойств, к примеру, улучшению утилизации данным микроорганизмом дешевого сырья повышается рентабельность биотехнологического производства, снижается себестоимость целевого продукта при сохранении его качественных характеристик.

Однако сверхсинтез того или иного биологически активного вещества, достигнутый в стенах лаборатории, это не норма для данного микроорганизма и его контрольные механизмы, генетически детерминированные механизмы могут привести к реверсии метаболических процессов, нестабильности сверхпродукцирующей активности. Это одна из методологических, технологических проблем, постоянно существующих при разработке промышленных микроорганизмов. Некоторые примеры использования промышленных микроорганизмов приведены на таблице 1.

Несколько проще разработка промышленного микроорганизма в случае, когда конечным продуктом является сама микробная биомасса, используемая в качестве биоудобрения, биоинсектицида и др. В этих случаях не столь остро ставится вопрос об активации синтеза того или иного микробного метаболита.

Промышленные микроорганизмы и продукты их синтеза

Организм	Тип	Продукт
<i>Пищевые продукты и напитки</i>		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Дрожжи	Пекарские дрожжи, вино, эль,
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	»	Лагерное пиво
<i>Saccharomyces rouxii</i>	»	соевый соус
<i>Candida milleri</i>	»	Кислый французский хлеб
<i>Lactobacillus sanfrancisco</i>	Бактерия	То же
<i>Streptococcus thermophilus</i>	»	Йогурт
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	»	»
<i>Propionibacterium shermanii</i>	»	Швейцарский сыр
<i>Gluconobacter suboxidans</i>	»	Уксус
<i>Penicillium roquefortii</i>	Плесень	Сыры типа рокфоры
<i>Penicillium camtbertii</i>	»	Сыры камамбер и бри
<i>Aspergillus oryzae</i>	»	Саке (гидролиз рисового крахмала)
<i>Rhizopus</i>	»	Темпе
<i>Mucor</i>	»	Суфу (соевый творог)
<i>Monascus purpurea</i>	»	Анг – как (красный рис)
<i>Промышленные химические вещества</i>		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Дрожжи	Этанол (из глюкозы)
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Дрожжи	Этанол (из лактозы)
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Бактерия	Ацетон и бутанол
<i>Aspergillus niger</i>	Плесень	Лимонная кислота
<i>Xanthomonas campestris</i>	Бактерия	Полисахариды
<i>Аминокислоты и нуклеотиды (как вкусовые добавки)</i>		
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Бактерия	L-Лизин
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	»	5' - Инозиновая кислота
		5' - Гуаниловая кислота
<i>Белки одноклеточных</i>		
<i>Candida utilis</i>	Дрожжи	Микробный белок из отходов бумажной промышленности
<i>Saccharomycopsis lipolytica</i>	»	Микробный белок из алканов нефти
<i>Methylophilus methylotrophu</i>	Бактерия	Микробный белок при росте на метане или метаноле
<i>Витамины</i>		
<i>Eremothecium</i>	Дрожжи	Рибофлавин
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	Бактерия	Витамин B ₁₂
<i>Propionibacterium</i>	Бактерия	Витамин B ₁₂

Ферменты		
<i>Aspergillus oryzae</i>	Плесень	Амилаза
<i>Aspergillus niger</i>	»	Глюкоамилаза
<i>Trichoderma reesii</i>	»	Целлюлаза
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Дрожжи	Инвертаза
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	»	Лактаза
<i>Saccharomycopsis lipolytica</i>	»	Липаза
<i>Aspergillus</i>	Плесень	Пектиназы и протеазы
<i>Bacillus</i>	Бактерия	Протеазы
<i>Endothia parasitica</i>	Плесень	Микробный сычужный фермент
Полисахариды		
<i>Leuconostos mesenteroides</i>	Бактерия	Декстран
<i>Xanthomonas campestris</i>	»	Ксантан
Лекарственные вещества		
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Плесень	Пенициллины
<i>Cephalosporium acremonium</i>	»	Цефалоспорины
<i>Streptomyces</i>	Бактерия	Амфотерицин В, канамицины, неомицины, стрептомицин, тетрациклин и др.
<i>Bacillus brevis</i>	»	Грамицидин С
<i>Bacillus subtilis</i>	»	Бацитрацин
<i>Bacillus polymyxa</i>	»	Полимиксин В
<i>Rhizopus nigricans</i>	»	Трансформация стероидов
<i>Arthrobacter simplex</i>	Бактерия	»
<i>Mycobacterium</i>	»	»
Гибридомы	-	Иммуноглобулины и моноклональные антитела
Клеточные линии млекопитающих	-	Интерферон
<i>Escherichia</i> (с помощью технологии рекомбинантных ДНК)	Бактерия	Инсулин, человеческий гормон роста, соматостатин, интерферон
Каротиноиды		
<i>Blakeslea trispora</i>	Плесень	β -Каротин
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Дрожжи	Астаксантин
Энтомопатогенные бактерии		
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Бактерия	Биоинсектициды
<i>Bacillus popilliae</i>	»	»

На таблице 2 приведены некоторые возможности применения микроорганизмов в пищевой, химической промышленности, фармацевтике. Промышленные микроорганизмы широко применяются и в иных отраслях промышленности, в других областях хозяйственной деятельности:

◆ в биогеометаллургии, с целью извлечения металлов из бедных руд путем выщелачивания, превращения водонерастворимых солей металлов в растворимые (*Thiobacillus spp.*, *Leptospirillum ferroxidans*, *Sulfolobus spp.*): также при осаждении, аккумуляции тяжелых металлов из загрязненных источников (*Pseudomonas*, *Zooglea*, *Desulfuricans*, *Leptothrix*, *Sphaerotlis* и др.):

◆ в очистке сточных вод используются аэробные и анаэробные микроорганизмы (*Actinomyces*, *Actinobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium* и др.), которые окисляют спирты, жирные кислоты, парафин, ароматические углеводы, фенолы;

◆ биоудобрения, в частности препараты нитрагин и азотобактерин применяются для обогащения почвы связанным азотом (*Bacillus spp.*);

◆ биоинсектициды, включающие патогенные для насекомых (колорадский жук, тля, яблоневая плодожорка, озимая совка и др.) грибы, бактерии и вирусы (*Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana*, *Trichoderma spp.*, *Verticillum lecanii* и др.)

◆ биодegradация ксенобиотиков, синтетических соединений, загрязняющих почву и воду может быть до полной минерализации, либо имеет место частичная, неполная деградация, либо их накопление, полимеризация. Соединения, которые подверга-

Таблица 2

Возможности применения микроорганизмов

- Утилизация отходов, контроль за состоянием окружающей среды;
- Получение энергии (биоэнергии);
- Получение кормов, пищевых добавок, напитков, изделий бытовой химии;
- Извлечение минерального сырья;
- Очистка и концентрация веществ;
- Получение физиологически активных соединений;
- Применение для биосинтеза, биотрансформации, биодegradации;
- Используются в медицине, ветеринарии, растениеводстве;
- Используются в биоэлектронике.

ются полной деградации, т.е. минерализации до диоксида углерода, воды, аммиака, сульфатов и фосфатов, обычно проходят весь метаболический путь и могут использоваться в качестве источника углерода и энергии микроорганизмами.

В природных экосистемах в процессах биodeградации, биотрансформации участвуют сообщества микроорганизмов, смешанные культуры, где на разных стадиях расщепления субстрата участвуют различные группы микроорганизмов. Участие в процессах биodeградации ассоциаций микроорганизмов, а не монокультуры имеет следующие преимущества:

- способность утилизировать сложные, неоднородные по составу субстраты;
- способность к минерализации сложного органического соединения;
- повышенная способность к биотрансформации органических веществ;
- повышенная устойчивость к токсическим веществам, в том числе к тяжелым металлам;
- повышенная устойчивость к действию абиотических и биотических факторов окружающей среды;
- повышенная продуктивность, биodeградирующая способность.

В биотехнологии нередко используются ассоциации, специально подобранные штаммы из различных групп микроорганизмов, участвующие в процессах брожения, трансформации, деградации и др. Так в пищевой промышленности при разработке заквасок для молочнокислых продуктов используется консорциум из кефирных грибков, лактобацилл, стрептококков. Пробиотики, применяемые при кишечном дисбактериозе включают ассоциации нескольких видов лактобацилл, бифидобактерий, кишечную палочку M-17; могут быть в этом составе бациллы, молочнокислые стрептококки.

К группе промышленных, производственных микроорганизмов можно отнести вакцинные штаммы бактерий и вирусов. Это аттенуированные (с ослабленной вирулентностью), инактивированные, субъединичные вакцины. Это особая группа производственных микроорганизмов, требующая режимных

условий хранения и поддержания, так как они получены из патогенных микроорганизмов, опасных для здоровья человека.

В ряде случаев промышленные микроорганизмы адсорбируются на носителях и в иммобилизованной форме используются в биотехнологическом производстве (табл. 3). В качестве носителя, адсорбента применяются полимерные гели, полимерные пленки, полупроницаемые мембраны, пористые волокна и микрокапсулы. В качестве носителя используются целлюлоза, поливинилхлорид, полистерол, силикон, полиацетил и другие соединения, обладающие гидрофильными свойствами. Иммобилизация микробных клеток на носителе позволяет достичь определенных преимуществ в технологическом процессе, а именно:

- упрощение разделения использованных микроорганизмов и среды культивирования, содержащей целевой продукт;

- заметно более длительная эксплуатация биокаталитических свойств клеток в иммобилизованном состоянии в противовес, как правило, однократному использованию свободных культур;

- снижение энергозатраты на технологический процесс в целом, так как среда культивирования нередко содержит меньшее количество растворимых примесей и тем самым упрощается процедура выделения и очистки конечного продукта.

Использование в биоэлектронике в качестве биологических микроустройств – датчиков, процессоров и исполнительных элементов. Модель биологической сенсорной системы включает в себя биосенсор (ферменты, полиферментную систему, антивещества, органеллы, бактериальные клетки, клетки животных, растительные ткани), иммобилизованный в непосредственном контакте с соответствующим преобразовательным устройством для превращения биохимической реакции в количественный электрический или оптический сигнал. Биосенсоры характеризуются следующими достоинствами:

- биологический материал для микроустройств (микробные клетки, ферменты и др.) сравнительно дешев, эти ресурсы практически не ограничены, а стоимость их выделения, очистки и иммобилизации снижается;

Применение иммобилизованных клеток для получения аминокислот и олигопептидов

Продукт	Субстрат	Микроорганизм	Носитель
Аспарагиновая кислота	Фумарат аммония	<i>Escherichia alcalescens, E.coli</i>	ПААГ, агар, агароза, каррагинан, полиазетидин, полые волокна
Глутаминовая кислота	Фумарат аммония	<i>Pseudomonas docunhae + E.coli</i>	Каррагинан
Аланин	Аспарагиновая кислота	<i>Pseudomonas docunhae</i>	ПААГ, полиуретан, каррагинан, желатина
С-Аланин	С-глюкоза	<i>Corynebacterium dismutans</i>	ПААГ
Глутаминовая кислота	Глюкоза	<i>C. glutamicum</i>	ПААГ, каррагинан
"	Глюкоза	<i>Brevibacterium flavum</i>	Коллаген
"	Глюкоза	<i>C.lilium</i>	Коллаген
Аргинин	Глюкоза	<i>B.subtilis</i>	Каррагинан
Аргинин	Глюкоза	<i>Serratia marcescens</i>	Каррагинан
Изолейцин	Глюкоза	<i>Serratia marcescens</i>	Каррагинан
Фенилаланин	Транскоричная кислота	Дрожжи	Каррагинан
Фенилаланин	Фенилпируват+ НАД Индол+ пируват	<i>P.putida</i>	Каррагинан
Триптофан	Индол+пируват	<i>E.coli</i>	ПААГ
Тирозин	Фенол+пируват	<i>Erwinia herbicola</i>	Коллаген, ПААГ
Тирозин	"	<i>E.intermedia</i>	Са-альгинат
3,4-диоксифенилаланин (ДОФА)	Пирокатехин + пируват	<i>Citrobacterium freundii</i>	Каррагинан
Хоризмовая кислота	"	<i>Enterobacter aerogenes</i>	ПААГ
3-индолилуксусная кислота	Триптофан	<i>Azotobacter vinelandii</i>	ПААГ
Орнитин	L-аргинин	<i>Streptococcus faecalis</i>	ПААГ
Цитруллин	Аргинин	<i>P.putida</i>	каррагинан
Глутатион	Глутаминовая кислота+цистеин+ глицин	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ПААГ, каррагинан

Примечание. Цит. по Сеницыну А.П. и др., 1994.

– биоустройства способны преобразовывать энергию самых различных видов (химическую, механическую, световую, электрическую), причем в ряде случаев возможно обратное преобразование;

– коэффициент полезного действия биопреобразователей высок, что определяет автокаталитический характер проходящих в них процессов превращения энергии;

– биодатчики обеспечивают регистрацию широкого спектра веществ и характеризуются огромной чувствительностью (концентрация обнаруживаемого вещества достигает 10^{-8} – 10^{-19} М);

– возможно создание набора типовых преобразователей – модулей, что увеличивает скорость протекания процесса.

В отдельную группу можно выделить микроорганизмы, являющиеся продуцентами белка. Синтезируемый ими белок используется в качестве пищевых добавок или корма для животных. Биомасса одноклеточных организмов, благодаря высокому содержанию метионина, лизина, витаминов и важных минералов обладает востребованной ценностью. При этом субстрат, используемый микроорганизмами при синтезе белка достаточно дешевый (табл. 4).

Благодаря успехам в области молекулярной биологии, генетической инженерии, в настоящее время в качестве биологических агентов – промышленных микроорганизмов использу-

Таблица 4

Субстраты и микроорганизмы, используемые при производстве белка одноклеточных организмов

Субстрат	Микроорганизм
Диоксид углерода	<i>Spirulina maxima</i> (цианобактерии)
Сыворотка (лактоза)	<i>Kluyveromyces fragilis</i> (дрожжи)
Алканы нефти	<i>Candida lipolytica</i> (дрожжи)
Целлюлозные отходы	<i>Chaetomium cellulolyticum</i> (грибы)
Метан	<i>Methylophilus methylotrophus</i> (бактерии)

ются генетически модифицированные микроорганизмы. Принципиально новые возможности в биопродуцирующей способности генетически модифицированных микроорганизмов (синтез чужеродных белков, в том числе эукариотных, биологически активных веществ не микробной природы и др.) стали возможны в силу сочетания достижений селекционной технологии и генетической инженерии.

В различных отраслях биотехнологического производства используются генетически модифицированные бактерии, актиномицеты, дрожжи и мицелиальные грибы (табл. 5).

Таблица 5

Генетически модифицированные микроорганизмы-продуценты

<i>Escherichia coli</i>	Интерферон, инсулин
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	расщепляет крахмал до этанола, (природный штамм расщепляет крахмал до глюкозы)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	стимулирует рост растений и ингибирует фитопатогенный грибок (природный штамм- только стимулирует рост растений)
<i>Aspergillus nidulans</i>	Интерферон
<i>Pichia pastoris</i>	эритропоэтин, щелочная фосфатаза
<i>Baculovirus</i>	липаза, интерферон

Генетически модифицированные микроорганизмы используются как продуценты в биотехнологическом производстве, а также как источник определенных генов со специфическими функциями. К примеру, выделенный из термальных бактерий ген, кодирующий термостабильную ДНК-полимеразу используется при постановке полимеразной цепной реакции, а генетически модифицированный штамм *Corynebacterium glutamicum* используется как более эффективный продуцент аминокислот, рекомбинантная *E. coli* создана как сверхпродуцент аминокислоты L-треонина и фенилаланина.

Именно штаммы *E. coli*, как наиболее изученные по своим фено- и генотипическим характеристикам были одними из первых рекомбинантных микроорганизмов, созданных как проду-

центры человеческого интерферона и инсулина. Наряду с *E.coli* «первенцами» в технологии рекомбинантных ДНК были штаммы *S.cerevisiae* и *B. subtilis* в силу их безопасности для человека и как широко используемые в биотехнологии промышленные микроорганизмы.

Созданы генетически модифицированные штаммы *S.cerevisiae*, синтезирующие рекомбинантные белки используемые, в качестве:

- вакцин: HBs антиген гепатита В, белок малярийного плазмодия, белок оболочки HIV-1;

- диагностических препаратов: белок вируса гепатита С, антиген HIV-1;

- лекарственных средств: фактор роста энтеродермиса, инсулин, инсулиноподобный фактор роста, тромбоцитарный фактор роста, проинсулин, фактор роста фибробластов, колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов, L-антитрипсин, фактор XIIIa системы свертывания;

- ферментов: в пищевой промышленности используется бычий фермент химозин или аспартилпротеиназа, которая расщепляет казеин, вызывая свертывание молока при сыроварении. Создан рекомбинантный штамм *S.cerevisiae*, синтезирующий данный фермент, что упрощает и удешевляет его продукцию и использование.

Исследователями экспрессирован в *S.cerevisiae* ген, кодирующий синтез таумотита – растительного белка, превосходящего сахарозу по сладости в 3 000 раз. В технологии пивоварения издавна используются селекционированные культуры *S.cerevisiae*. В процессе пивоварения образуются β -глюканы, осложняющие очистку, осветление пива. Был разработан рекомбинантный штамм *S.cerevisiae*, в геном которого экспрессирован ген, кодирующий синтез фермента β -глюконазы, расщепляющей β -глюканы и тем самым улучшающий технологию осветления пива.

Методы генетической инженерии позволяют создавать рекомбинантные штаммы микроорганизмов, синтезирующие Fab-фрагмент моноклональных антител. Известно, что гибридомы – продуценты моноклональных антител, являясь клетками животного происхождения растут относительно медленно на много-

компонентных дорогах питательных средах для тканевых культур. В итоге полученные моноклональные антитела из-за высокой себестоимости не всегда рентабельны для широкого применения даже в медицинской практике, не говоря о ветеринарии. Один из возможных путей удешевления и упрощения технологии синтеза моноклонов – это клонирование в клетках микроорганизмов гена, ответственного за синтез Fab-фрагмента антител. Последний может быть использован с иммунотерапевтической целью как антигенсвязывающий белок при адресной доставке к больному органу лекарственного вещества.

Конечно же, в технологии использования модифицированных микроорганизмов, продуцирующих те или иные белки животного происхождения есть проблемы, методологические трудности, обусловленные особенностями эукариотических и прокариотических клеток (рис. 9, 10).

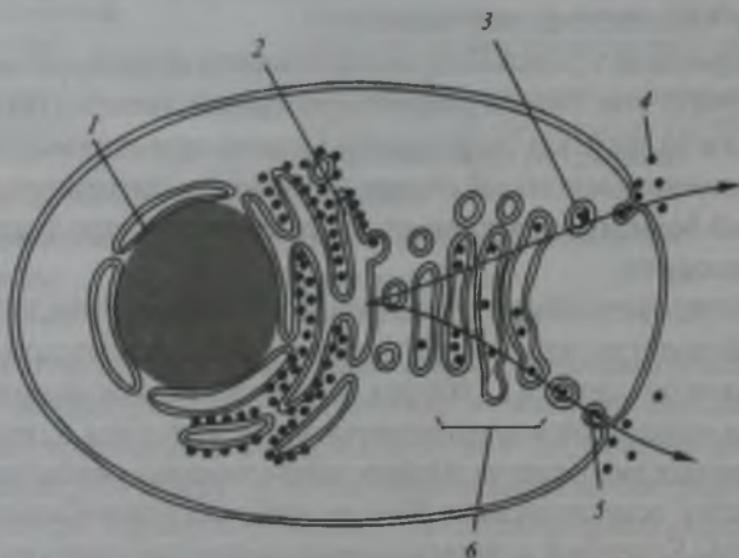


Рис. 9. Путь секретируемого белка
в эукариотической клетке:

- 1-ядро; 2-шероховатый эндоплазматический ретикулум;
3-секреторный пузырек; 4-секретируемый белок; 5-секреторный
пузырек в момент экзоцитоза; 6-аппарат Гольджи.

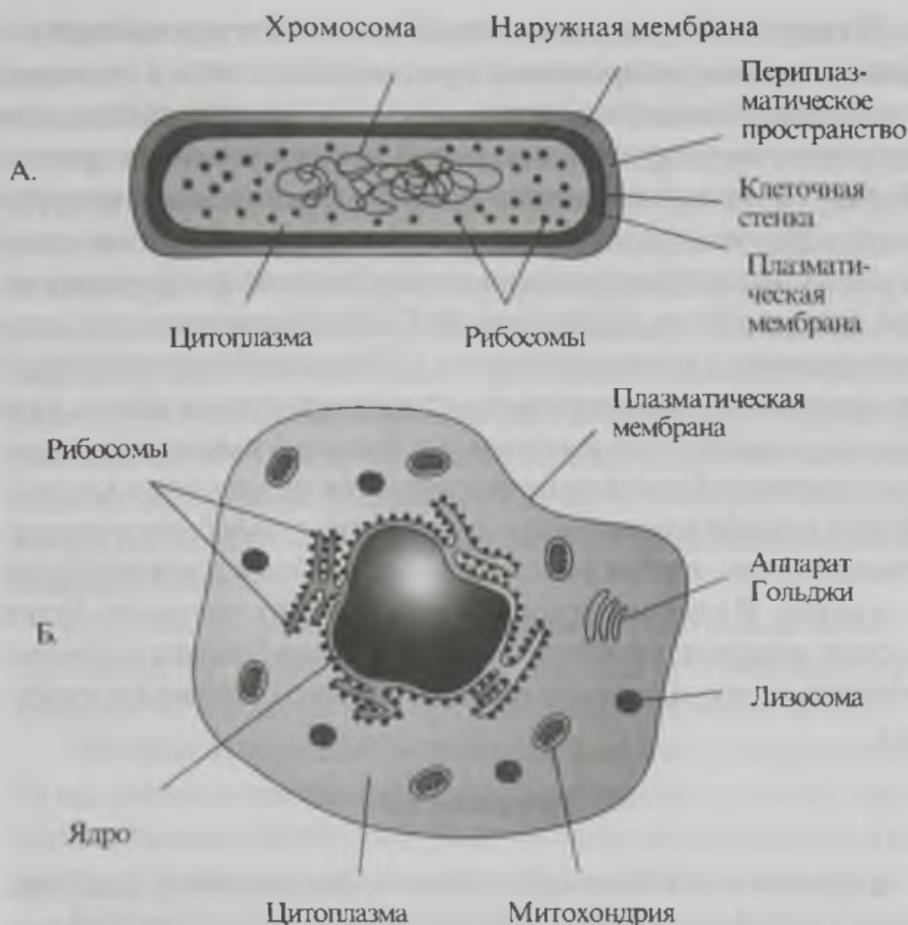


Рис. 10. Схематическое представление прокариотической бактериальной клетки (А) и эукариотической животной клетки (Б).

Так при сверхсинтезе чужеродных белков в цитоплазме прокариотной клетки, к примеру, генетически модифицированного штамма *E. coli* образуются включения этих белков, из-за их гидрофобности, водонерастворимого состояния последних. Одной из причин столь нежелательного результата является отсутствие в прокариотах системы гликозилирования белков, уменьшающей их гидрофобность. Поэтому синтезируемые в бактериальных клетках белки животного происхождения частично осаждаются в клетке, не выделяясь в среду культивирования.

Чужеродный эукариотический белок, синтезированный в генетически модифицированной прокариотной клетке и лишенный гликозилированной части оказывается менее стабильным, легче подвергается разрушению под действием клеточных протеаз. Наряду с гликозилированием эукариотические белки претерпевают и другие, необходимые для сохранения биологической активности посттрансляционные модификации: фосфорилирование, ацилирование, амидирование С-концов аминокислот, дезаминирование, метилирование и т.д. Поэтому белки животного происхождения, синтезированные в прокариотных клетках, даже при сохранении своих изначальных функций имеют определенные отличия от белков синтезированных в эукариотных клетках. Использование в качестве продуцента животных белков эукариотных систем – клеток мицелиальных грибов и дрожжей более адекватно. В клетках дрожжей удастся синтезировать белки высших эукариот, в гораздо большей степени близких по биологическим характеристикам исходным белкам человека и животных.

Ферменты

Ферменты, особенно микробного происхождения, выполняющие специфическую каталитическую функцию в расщеплении, синтезе, трансформации органических соединений, некоторыми авторами выделяются как отдельная группа биологических агентов, используемых в биотехнологическом производстве. Источниками ферментов могут быть не только микробные, но и растительные, животные клетки. Независимо от источника, клетки-хозяина ферменты характеризуются двумя основными биологическими свойствами – каталитической активностью и избирательностью действия.

В пользу того, что ферменты позволительно выделить в отдельную группу биологических агентов можно привести следующее. В пищевой промышленности при расщеплении крахмала в основном используются ферменты α – амилаза, глюкоамилаза, глюкоизомераза. Продуцентом α – амилазы чаще всего является *Bacillus amyloliquefacies*, а глюкоамилазы –

Aspergillus niger. L – амилаза обладает способностью гидролизовать L-1,4 – связи в молекуле амилозы и амилопектина с образованием глюкозы, мальтозы и различных L-декстринов. Фермент глюкоамилаза интенсивно расщепляет декстрин с образованием глюкозы. Ферментационные процессы, лежащие в основе производственного цикла протекают с повышением температуры субстрата, среды культивирования. Поэтому с целью сохранения активности белка-фермента при повышении температуры в ферментере α – амилаза была выделена из бацилл, естественной средой обитания которых были горячие водные источники. Путем последовательной селекции были получены штаммы бацилл, синтезирующие в сотни раз больше α – амилазы, нежели исходный природный штамм данного вида микроорганизма.

Из сотен ферментов, используемых в биотехнологическом производстве, немногим более 20 наиболее востребованы и составляют 90% объема всех производимых ферментов (табл. 6).

По катализирующей активности ферменты подразделяются на: оксиредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы и лигазы (синтетазы). Большинство используемых в биотехнологии промышленных ферментов относится к гидролазам.

Многолетний опыт селекции промышленных микроорганизмов, достижения молекулярной биологии, генетической и белковой инженерии позволяют вносить изменения в нуклеотидную либо аминокислотную последовательность белка-фермента и тем самым получать термостабильные ферменты, ферменты, устойчивые к окислительной инактивации, ферменты с высокой каталитической активностью и специфичностью действия.

Модификация структуры фермента, стабилизация его биокаталитической активности, иммобилизация фермента на носителе – задачи инженерной энзимологии.

Иммобилизация – это ограничение подвижности молекул ферментов, их конформационных перестроек. Иммобилизация основана на физико – химических принципах, позволяющих закрепить структуру фермента таким образом, чтобы его активный центр сохранял свою каталитическую активность в течение дли-

Некоторые ферменты и их применение

Ферменты	Применение
L-амилаза	Пивоварение, производство спирта
Аминоацилаза	Получение L-аминокислот
Бромелаин	Размягчение мяса, осветление соков
Каталаза	Антиоксидант в готовых к употреблению пищевых продуктах
Целлюлаза	Получение спирта и глюкозы
Физин	Размягчение мяса, осветление соков
Глюкоамилаза	Пивоварение, производство спирта
Инвертаза	Инверсия сахарозы
Лактоза	Утилизация сыворотки, гидролиз лактозы
Липаза	Сыроварение, получение ароматизаторов
Папаин	Размягчение мяса, осветление соков
Пектиназа	Осветление соков, производства спирта
Протеаза	Детергент, производство спирта
Ранет	Сыроварение

тельного времени. Существуют различные способы иммобилизации, в том числе следующие.

Иммобилизация путем адсорбции или химической сшивки.

Для этого фермент (биологический объект) фиксируют на поверхности неорганического (силикагель, пористое стекло, песок, обожженная глина, керамика, бентонит, гидроксид титана, циркония, железа и т.д.) или органического (целлюлоза, хитин, ионообменные смолы, нейлон, полиэтилен, полистирол) носителей. С целью снижения отрицательного влияния химической сшивки с носителем на функциональную активность фермента проводят удаление места сшивки от активного центра фермен-

та. Если фермент имеет гликопротеидную природу, ковалентную сшивку проводят на углеводной, а не белковой части ферментной молекулы.

Иммобилизация путем включения в полимерную структуру.

Полимерные материалы: альгинат, каррагинан, коллаген, желатина, целлюлоза, хитин, полиакриламид. К примеру, фермент, внося в раствор мономеров альгината/каррагинана и полученную смесь по каплям добавляют в водный раствор соответствующих катионов. Образуются сферические полимерные частицы, несущие иммобилизованный биокатализатор. Иммобилизация в ПААГ состоит во внесении биокатализатора в раствор мономера (акриламида). При соответствующих условиях происходит полимеризация, образование полимеров (полиакриламид), в которые ковалентно вшит биокатализатор.

2. Культуры клеток и ткани растений

Сельскохозяйственные и декоративные растения возделываются человеком многие сотни лет, постоянно улучшаются их полезные свойства путем селекции. Среди нескольких тысяч растений, применяемых в сельском хозяйстве, широко используются около 2000 видов, но наиболее значимы в человеческой жизнедеятельности немногим более 200 видов. Высокое качество этих растений – итог многолетней работы селекционеров, семеноводов и других специалистов.

Такие культурные растения как ячмень, лен, бобы, лук, виноград, оливковое дерево, фасоль, картофель, кукуруза, горох, соя, рис, пшеница и многие другие имеют многолетнюю историю их совершенствования, сохранения и улучшения продовольственных характеристик.

Одна из первых семеноводческих французских компаний «Вильмерен» была организована еще в 1774 году. В 1760 году Кельрейтер успешно скрестил два близкородственных вида – махорку и табак и получил межвидовой гибрид (в последующем метод так и назван – межвидовая гибридизация).

В Европу для производства сахара вначале завозили сахарный тростник из тропических стран, затем сахар стали получать из местной культуры – свеклы. Корни свеклы содержали около 5-6% сахара, благодаря успешной селекционной работе постепенно содержание сахара было увеличено до 16-20%. Примерно такие же хорошие результаты были получены при селекции картофеля (содержание крахмала возросло с 8 до 20%). Широко востребованная сельскохозяйственная культура тритикале – это результат успешного скрещивания пшеницы с рожью. Известный советский ученый-селекционер И.В.Мичурин создал более 300 сортов разных культурных растений.

Вышеприведенные примеры успешной селекции культурных растений, конечно же, основывались на учении Ч.Дарвина («Происхождение видов путем естественного отбора», 1853), закона наследственности (Г. Мендель, 1865), на фундаментальных открытиях в области биологии и генетики клетки.

Особо значима в селекции технология гибридизации (скрещивания) отдаленных видов растений (культурных и диких сородичей), в итоге дающая разнообразный генетический материал – залог успешной селекции («генетическое разнообразие – палитра селекционера»). Примером может быть сорт сильной озимой пшеницы Безостая-1, в которой сочетаются такие ценные качества как сравнительно короткая и прочная соломина, устойчивость к полеганию, высокая продуктивность колоса и урожайность, зимостойкость, хорошие мукомольно-хлебопекарные свойства зерна. Безостая-1 – это результат длительного и сложного селекционного процесса; для ее создания использовали сорта различных стран и континентов. Этот сорт отличается экологической пластичностью и высокой отзывчивостью на повышение дозы удобрений и на орошение. Внедрение сорта Безостая-1 в производство обеспечило среднюю прибавку урожая зерна на 3-4 ц/га, что позволило ежегодно получать дополнительно 2,0-2,5 млн. тонн высококачественного зерна (Гужов Ю.Л. и др., 1984).

Высокая продуцирующая способность многих сортов продовольственных, технических и лекарственных растений, полученная путем селекции оптимально проявляется при долж-

ной агротехнике, при соблюдении технологии выращивания культуры. Столь же существенно влияние на продуктивность сельскохозяйственных растений абиотических (низкая или высокая температура, засуха, засоленность почвы, нарушение плодородного слоя почвы, наличие пестицидов и др.) и биотических (насекомые – вредители, фитопатогены и др.) факторов.

Традиционная селекция культурных растений складывается из внутри – и межвидового полового скрещивания с последующим получением гибридов, превосходящих исходные сорта по продуктивности и устойчивости к неблагоприятным факторам окружающей среды.

Однако половое скрещивание – это очень ограниченная и строго регламентированная система гибридизации, где в качестве родительских форм можно использовать лишь определенные организмы в известных сочетаниях. Каждое отдельное растение-потомок несет равные количества генов от обоих родителей. Для удаления большей части генов дикого вида приходится проводить многократные возвратные скрещивания полученного гибрида с исходной культурной родительской формой. Эта работа занимает многие годы (Г.Ж. Валиханова, 1996).

Освоение методов культивирования клеток и тканей растений *in vitro* явилось основой успешного совершенствования и дальнейшего развития достижений в агротехнологии целых растений. Возможность культивирования различных соматических клеток растений и тотипотентность этих клеток обусловили появление нового способа скрещивания – неполового скрещивания или соматической гибридизации.

Тотипотентность (от лат. *totus* – весь, целый; *potentio* – сила) – свойство клеток в полной мере реализовать присущую им генетическую информацию, обеспечивающую их дифференциацию и дальнейшее развитие до целого организма. Обычно универсальной тотипотентностью обладают оплодотворенные яйцеклетки растений и животных. Что касается соматических клеток, тотипотентностью обладают клетки растений, преимущественно в условиях *in vitro*.

Соматическая гибридизация как результат применения клеточных технологий в селекции растений позволила преодо-

леть барьер половой несовместимости между родительскими клетками, резко расширила разнообразие генетического материала гибридных клеток. А генетическое разнообразие – источник получения новых сортов растений; чем больше различающихся по генотипическим и фенотипическим характеристикам гибридных клеток, тем больше возможность достижения искомой цели – получение нового сорта.

Если в традиционной биотехнологии или агротехнологии объектом является целое растение, то развитие методов клеточной селекции позволило в качестве биотехнологического объекта использовать культуры клеток и тканей растений.

Каллус представляет собой неорганизованную, пролиферирующую ткань, состоящую из дедифференцированных клеток. Каллус («мозоль») может образовываться на изолированных кусочках растительной ткани (эксплантат) *in vitro*, либо на месте поранения растения. Культуры каллусных клеток получают путем культивирования отдельных фрагментов тканей растений (эксплантов) на питательных средах *in vitro* в колбах, флаконах, чашках Петри (рис. 11). Клетки эксплантированных тканей корня, стебля или мезофилла листа на питательную среду (содержащую минимальные концентрации солей, источников углерода, витаминов и гормоноподобных веществ) дедифференцируются, т.е. теряют структуру, характерную для их специфических функций в растении; они индуцируются к делению, образуя первичный каллус. Каллусная ткань аморфна и не имеет конкретной анатомической структуры, но в зависимости от происхождения и условий выращивания она может быть разной консистенции: рыхлой, состоящей из сильно оводненных клеток; средней плотности, с хорошо выраженными меристематическими очагами; плотной, в которой дифференцированы элементы камбия и проводящей системы.

Каллусные клетки отличаются большой генетической гетерогенностью (различной ploидностью, отличием по числу хромосом) и физиологическими особенностями. Генетически гетерогенные каллусные клетки являются хорошим материалом для клеточной селекции на устойчивость к фитопатогенам,



Рис. 11. Регенерация растений из каллуса листовых дисков на селективной среде.

стрессовым ситуациям и на повышенный синтез полезных метаболитов.

Культуры клеток и тканей растений *in vitro* характеризуют собой новый этап развития биотехнологии растений по следующим причинам:

- возможность получения растений – регенерантов, характеризующихся сочетанием высокой продуктивности и устойчивости к неблагоприятным факторам (к фитопатогенам, к засолению и др.) за сравнительно короткий срок в отличие от традиционной селекции;

- культивируемые в промышленных условиях клетки способны к биосинтезу необходимых биологически активных соединений и к биотрансформации дешевого субстрата в конечный продукт;

- представляют собой модель для исследования клеточного метаболизма и его регуляцию, последующие рост и развитие целого растения;

– культура клеток растений позволяет исследовать влияние отдельных абиотических и биотических экзогенных факторов либо их совокупности на продуктивность, синтез искомого метаболита, а также изучает генетику и физиологию биопродукторов;

– проводить селекцию на клеточном уровне, уже в условиях культивирования *in vitro* не только по устойчивости к экстремальным факторам, но и по сверхпродукции белков, аминокислот и других метаболитов.

В целом культивируемые клетки и ткани растений востребованы в биотехнологии (рис. 12, 13) как:

– продуценты алкалоидов, стероидов, гликозидов, фитогормонов, эфирных масел и других веществ, необходимых для медицины, парфюмерии, косметики и других отраслей. Чаще всего получают вышеуказанные вещества из каллусной ткани, выращенной на твердой (агаризованной) или жидкой (суспензионной) питательной среде;

– культуры изолированных тканей для размножения и оздоровления посадочного материала путем клонального микроразмножения (от 1 меристемы можно получить до 100 тысяч растений – регенерантов в год); изолированные клетки для селекции растений, устойчивых к засухе, засолению, фитопатогенам и другим стрессовым факторам путем слияния протопластов и получения неполловых (соматических) гибридов.

Необходимо отметить и тот факт, что при культивировании клеток и тканей *in vitro* в культуральной среде обнаружены, наряду с известными для целых растений веществами вторичного метаболизма и новые соединения из группы алкалоидов, терпеноидов, гликозидов, полифенолов, полисахаридов, эфирных масел, а также пептиды, подавляющие активность протеаз, репродукцию фитовирусов (табл. 7).

Вместе с тем при культивировании клеток и тканей растений даже в лабораторных условиях порой проявляется нестабильность достигнутых путем селекции результатов. В последующем растения – регенеранты, полученные из клонов, устойчивых к засолению или токсинам фитопатогенов не всегда сохраняют эти свойства. То есть факторы, механизмы резистен-

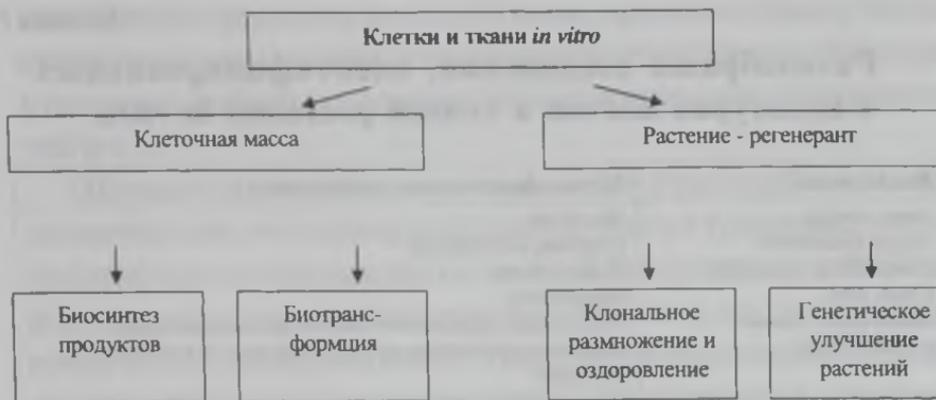


Рис. 12. Технологии на основе культивируемых клеток и тканей растений (Г.Ж. Валиханова, 1996).

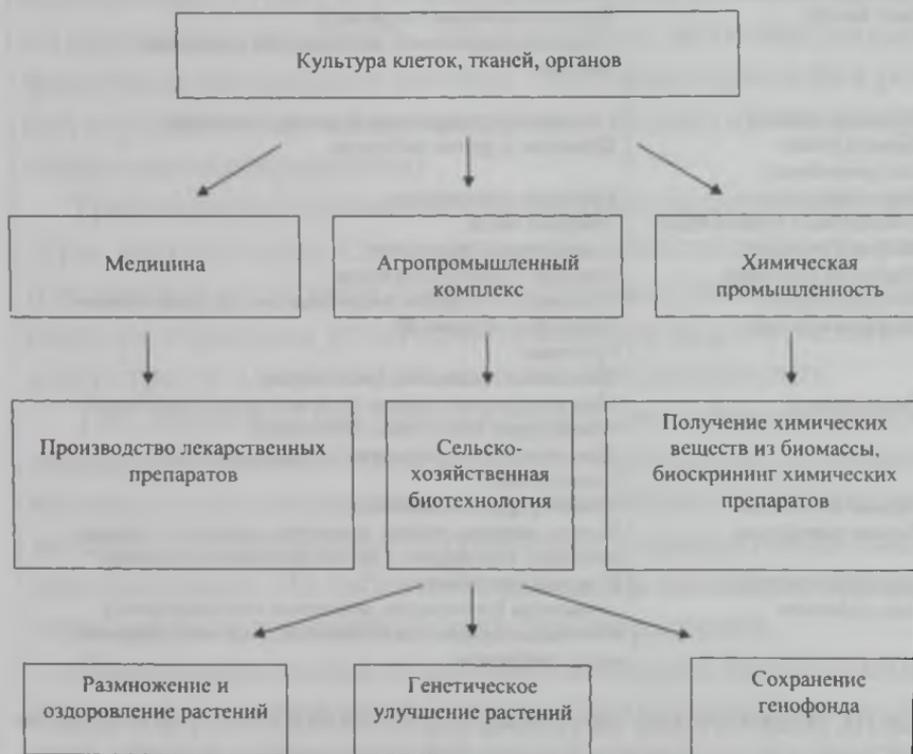


Рис. 13. Применение культур клеток (Г.Ж. Валиханова, 1996).

Разнообразие соединений, идентифицированных в культурах клеток и тканей растений *in vitro*.

Вид растения	Идентифицированные соединения
<i>Amm. visnaga</i>	Виснагин
<i>Atropa belladonna</i>	Атропин, гиосциамин
<i>Camptotheca acuminata</i>	Камптотецин
<i>Cassia tora</i>	Антрахинон
<i>Catharanthus roseus</i> (= <i>Vinca rosea</i>)	Аймалицин, серпентин и многие другие индольные алкалоиды; некоторые из них отсутствуют в исходном растении
<i>Cephalotaxus harringtonia</i>	Цефалотаксин, харрингтонин
<i>Coffea arabica</i>	Стигмастерол, кампестерол, ситостерол, кофеин, теобромин Розмариновая кислота
<i>Coleus blumei</i>	Берберин, пальмитин, коптисин, ятрорицин, магнофлорин
<i>Coptis japonica</i>	Гиосциамин, скополамин и другие тропановые алкалоиды Антрахиноны
<i>Datura stramonium</i> (или <i>innoxia</i>)	Стигмастерол, холестерин, ситостерол и многие другие стероиды
<i>Dioscorea purpurea</i> (или <i>lanata</i>)	Кардиотонические гетерозиды Стероидные сапонины, включающие диосгенин Эфедрин
<i>Dioscorea deltoide</i>	Гиосциомин, скополамин и другие алкалоиды
<i>Ephedra foliata</i> (или <i>gerardiana</i>)	Шиконин и другие пигменты
<i>Hyoscyamus niger</i>	Протопин, алокриптин
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Эфирные масла
<i>Macleaya microcar</i>	Антрахиноны, мориндин
<i>Matricaria camomilla</i>	Никотин и другие алкалоиды
<i>Morinda citrifolia</i>	Убихинон-10 и другие различные хиноны (пластохинон, токоферол, витамин К)
<i>Nicotiana tabacum</i>	Глутатион Фенольные соединения (скополетин)
<i>Panax ginseng</i>	Многочисленные стеролы (стигмастерол, сингостерол, кампестерол, холестерин, диосгенин) Многочисленные ферменты (фосфодиэстераза) Гинсеносиды
<i>Papaver bracteatum</i>	Тебаин и другие алкалоиды
<i>Papaver somniferum</i>	Кодеин, морфин, тебаин, папаверин, наркотин, нарцеин, протопин, сангинарин и другие различные алкалоиды
<i>Rauwolfia serpentine</i>	Резерпин, ресциамин
<i>Ruta graveolens</i>	Алкалоиды (рутакридон, различные метилакридоны) Фенольные соединения (бергаптен, псорален), эфирные масла, пигменты

тности, реализуемые на уровне клеточной культуры и целого растения различаются и в дальнейшем необходимы исследования по стабилизации превносимого в растение целевого признака. В этом плане совершенствуется одно- и многоступенчатый отбор культуры клеток по целевому признаку из суспензи-

онной культуры, из каллусной ткани, протопластов путем постепенного возрастания концентрации селективного фактора в культуральной среде – токсина фитопатогена, концентрации солей и т.д.

Широкое применение клеточных культур растений также сдерживается тем, что клетки медленно растут (удвоение растительной клетки происходит в течений 1-3 суток, это в 60-80 раз дольше, чем удвоение бактериальной клетки), продолжительно время их культивирования (2-3 недели), необходимость соблюдения асептических условий в период выращивания, порой низкое содержание в культуральной среде конечного продукта, чувствительность растительной клетки, в отличие от прокариотной к механическим повреждениям.

Размеры клеток растений в десятки и сотни раз больше клеток бактерий и грибов. Объем растительной клетки существенно меняется в онтогенезе – если в начале экспоненциальной фазы роста они мелкие и плотные, то в стационарной фазе роста они крупные и вакуолизованы, легко подвергаются при культивировании повреждению.

Требуемая при клеточной селекции биотехнологичность культуры растительных клеток складывается из их способности расти и размножаться на нескольких питательных средах, прототрофность по гормонам, устойчивость к осмотическому, механическому стрессу и, конечно же, высокая продуктивность.

Так, обработка каллусных клеток раувольфии змеиной этиленамином позволила получить клеточную линию, отличающуюся высоким содержанием антиаритмического алколоида аймалина (в 10 раз больше по сравнению с продуктивностью целого растения). На таблице 8 приведены сведения о промышленном использовании культуры тканей растений.

Самостоятельным объектом клеточной биотехнологии растений являются протопласты. *Протопласт* (*protos* – первый, *plestos* – образованный, вылепленный) – это лишённые клеточной стенки, ограниченные только цитоплазматической мембраной образования, имеющие все внутренние органоиды, обладающие полноценным метаболическим процессом, в том

числе способные выполнять биосинтетические и биотрансформирующие функции. Протопласты являются идеальным реципиентом для чужеродной ДНК, из-за отсутствия клеточной стенки они достаточно легко сливаются, образуя гибриды, несущие новые гено- и фенотипические признаки. Особо перспективны в популяции разнообразных мутаций протопласты гаплоидных растений.

Таблица 8

Промышленное производство вторичных метаболитов на основе культуры тканей растений

<i>Продукт</i>	<i>Растение</i>	<i>Применение</i>
шиконин	воробейник аптечный	ожоги, порезы, кожные заболевания
убихинон - 10	табак	болезни сердца
аймалицин	борвинок розовый	гипотензивное средство
камптотецин	камптотека остроконечная	противоопухолевое средство
берберин	контис японский	бактерицидное средство, от расстройства кишечника
антоциан	цветочный сбор, виноград	пигмент

Протопласты получают следующими методами:

1) механически путем плазмоллиза. Это отделение пристеночного слоя цитоплазмы от твердой оболочки растительной клетки (для этого кусочек растительной ткани помещают в раствор более концентрированный, чем цито-плазматическая жидкость. При выходе воды из клетки в более концентрированный окружающий раствор клеточная стенка сохраняет форму, как более регидное образование, а цитоплазматическая мембрана сжимается к середине клетки; клетка остается жизнеспособной;

2) химическим путем, используя ферменты, разрушающие компоненты клеточной стенки растений – целлюлазы, гемицел-

люлазы и пектиназы. Разрушение клеточной стенки проводится в осмотически стабилизированной среде (сахароза, сорбит и др.), предохраняющей цитоплазматическую мембрану от механического повреждения. Считается, что протопласты лучше выделять в логарифмической фазе роста растительной клетки. В этой фазе клеточная стенка легче всего поддается энзиматическому разрушению, а протопласты – наиболее жизнеспособны.

Результат получения протопластов зависит также от типа растительной ткани (лист, семядоля, корень, каллусная ткань, клеточная суспензия), вида и сорта растения. Видовые особенности, морфо-физиологическое состояние растительной ткани, т.е. ее гено- и фенотипические характеристики влияют на успешность выделения жизнеспособных протопластов. Меристематические и каллусные протопласты сливаются легко, а вакуолизированные, с развитым хлоропластом – труднее.

Успешное культивирование *in vitro* протопластов с последующей регенерацией из них целых растений осуществил в 1971 году Такебе (рис. 14).

В процессе культивирования протопласты восстанавливали клеточные оболочки и становились обычной культурой клеток растений. Через несколько недель формируются колонии каллусных клеток и тканей. Последние пересаживаются на агаризованные питательные среды для получения растения-регенеранта.

У табака и других представителей пасленовых (петуния, картофель, томаты) легко удается получить растение из протопластов (рис. 15), тогда как из злаковых и бобовых – двух основных семейств продовольственных растений это сделать достаточно сложно.

Протопласты являются биотехнологическим объектом, так как при их слиянии получают новые линии растительных клеток, несущие целевые признаки. Путем слияния протопластов можно переносить гены устойчивости к абиотическим и биотическим стрессовым факторам в растение-регенерант.

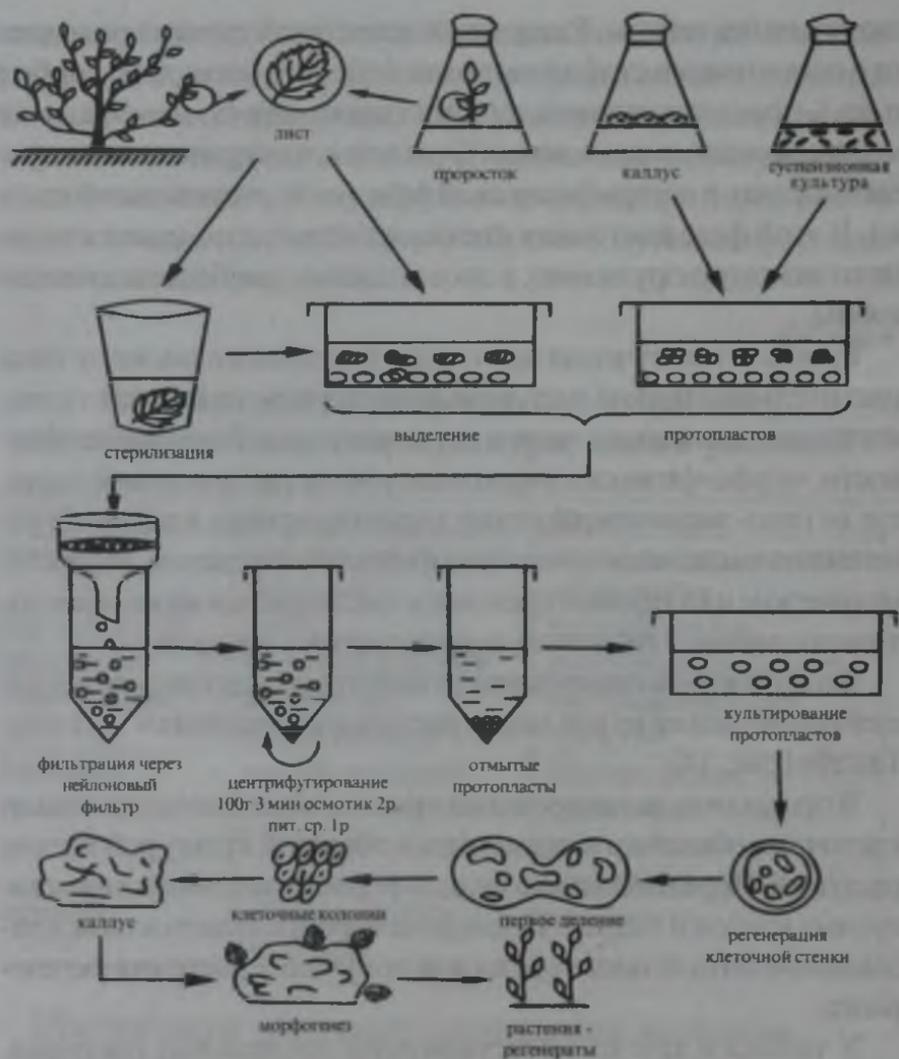


Рис. 14. Схема получения и культивирования протопластов из клеток растений (В.С. Шевелуха, 2003).

Применяется несколько методов слияния протопластов:

- слияние в присутствии веществ, способствующих этому (полиэтиленгликоль, поливиниловый спирт, ионы кальция);
- путем электростимуляции суспензии протопластов, приводящей к адгезии и слиянию последних.

В последние два десятка лет биотехнологические объекты стали пополняться трансгенными растениями, полученными на

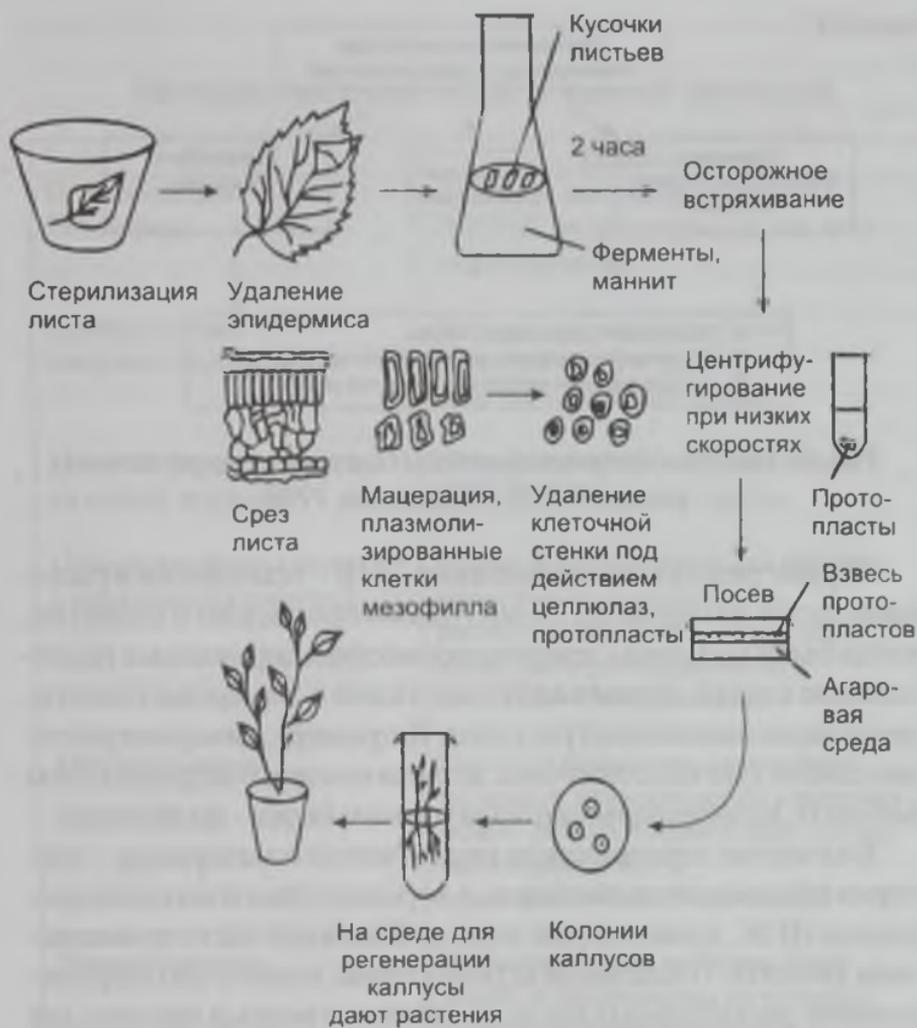


Рис. 15. Схема выделения, культивирования и регенерации растений из протопластов картофеля (Г.Ж. Валиханова, 1996).

основе технологии рекомбинантной ДНК. В начале была агротехнология или традиционная биотехнология растений, затем клеточная биотехнология или клеточная инженерия, последующий этап развития биотехнологии растений – генетическая инженерия (рис. 16).

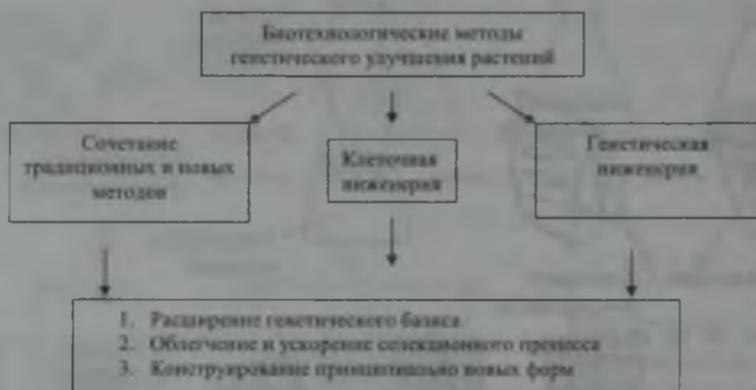


Рис. 16. Биотехнологические методы генетического улучшения растений (Г.Ж. Валиханова, 1996).

Первые результаты применения ДНК – технологий в растениеводстве датируются 80-ми годами прошедшего столетия, когда были получены генетически модифицированные растительные клетки, затем каллусные ткани и химерные (генетически видоизмененные) растения. К примеру, химерное растение санбин (это подсолнечник, в геном которого встроены гены бобовых, кодирующие синтез запасного белка – фазеолина).

В качестве переносчиков генетического материала – векторов используются плазмиды, хлоропластные и митохондриальные ДНК, транспозоны, вирусы. Наиболее часто применяемым является T1-плазида агробактерий, потому что инфицирование растительных клеток – это естественный процесс для этих микроорганизмов. На таблице 9 приведены некоторые методы введения чужеродной ДНК в растительные клетки.

При помощи векторов в растительный геном можно вводить гены растений других видов, животных клеток, бактерий и вирусов. Получены трансгенные сельскохозяйственные растения, в геном которых введены гены *Bacillus thuringiensis*, ответственные за синтез белка, токсичного для насекомых – вредителей. Получены трансгенные растения, устойчивые к колорадскому жуку (это картофель, кукуруза, хлопчатник); трансгенная культура сои, устойчивая к широко применявшемуся гербициду – глифосфату; трансгенный рис *Oryza sativa*, продуци-

Методы введения ДНК в клетки растений

<i>Метод</i>	<i>Комментарий</i>
Использование Ti-плазмид	Отличная высокоэффективная система, но применима не для всех видов растений
Бомбардировка микрочастицами	Используется для широкого круга растений и тканей; простой и дешевый метод
Использование векторов на основе вирусов	Неэффективный способ доставки ДНК в растительные клетки
Прямое введение генов в протопласты растений	Может использоваться для введения генов только в протопласты растительных клеток, из которых могут быть регенерированы жизнеспособные растения
Микроинъекции	Имеют ограниченное применение, поскольку одновременно инъекцию можно сделать только в одну клетку; манипуляции могут проводить только специалисты
Электропорация	Применяется для введения генов только в протопласты, из которых могут быть регенерированы жизнеспособные растения
Слияние липосом	Применяется для введения генов только в протопласты, из которых могут быть регенерированы жизнеспособные растения

рующий провитамин А (β -каротин); получены декоративные культуры, особенно цветы, имеющие совершенно различную окраску лепестков; получен трансгенный табак, в листьях которого никотина содержится на порядок меньше, нежели в исходных сортах. Уже более 100 трансгенных сортов растений, разре-

шенных к коммерческому использованию, в том числе более 20 трансгенных растений, устойчивых к гербицидам (соя, картофель, пшеница, томат, лен, кукуруза, хлопок, рис и др.) (табл. 10, 11). Первые трансгенные растения пшеницы были получены с помощью баллистической трансформации в 1987 году и с тех пор во многих лабораториях мира проводятся исследования по совершенствованию протоколов получения трансгенных растений пшеницы.

В последние годы разрабатываются технологии получения трансгенных растений, продуцирующих белки человека с целью терапевтического применения, продуцирующих протективные антигены микроорганизмов с целью создания съедобных вакцин; создаются трансгенные растения, устойчивые к вирусным заболеваниям (табл. 12, 13).

Таблица 10

Генетически трансформированные растения

Баклажан	Земляной орех	Овес
Банан	Канола	Овсяница высокая
Батат	Капуста	Овсяница красная
Бобы	Картофель	Огурец
Виноград	Киви	Орхидея
Гвоздика	Клюква	Палайя
Горох	Кукуруза	Петуния
Груша	Латук	Пион
Ежа сборная	Лен	Подорожник
Ель европейская	Лилия	Подсолнечник
Ель канадская	Лотос	Пшеница
Жемчужное просо	Люцерна	Рис
Земляника	Морковь	Рожь

**Трансгенные растения, полученные
бомбардировкой различных растительных
клеток микрочастицами**

<i>Растение (я)</i>	<i>Источник клеток</i>
Кукуруза	Суспензия зародышевых клеток, незрелые зиготические зародыши
Рис	Незрелые зиготические зародыши, зародышевый каллус
Ячмень	Суспензия клеток, незрелые зиготические зародыши
Пшеница	Незрелые зиготические зародыши
Дернообразующие злаки	Зародышевый каллус
Рожь	Меристема
Сорго	Незрелые зиготические зародыши
Жемчужное просо	Незрелые зиготические зародыши
Орхидные	Протокормы
Банан	Суспензия зародышевых клеток
Тополь	Каллус
Ель европейская и канадская	Соматические зародыши
Горох	Зиготические зародыши
Огурцы	Зародышевый каллус
Батат	Каллус
Клюква	Полученные <i>in vitro</i> части стебля
Пион	Пыльца
Люцерна	Зародышевый каллус
Бобы	Зиготические зародыши
Хлопок	Зиготические зародыши
Виноград	Суспензия зародышевых клеток
Земляной орех	Зародышевый каллус
Табак	Пыльца

Из работы Southgate et al., *Biotechnol. Adv.*, 13,631-651, 1995.

**Некоторые устойчивые к вирусам
трасгенные растения, синтезирующие
белки оболочки вирусов**

<i>Растение</i>	<i>Вирусы – источники генов</i>
<i>Nicotiana benthamiana</i> , <i>N. clevelandii</i>	Вирус скрытой мозаики сливы
<i>N. benthamiana</i> , тыква	Вирус 2 мозаики арбуза
<i>N. bethamiana</i> , тыква	Вирус желтой мозаики кабачков
Папайя, табак	Вирус кольцевой пятнистости папайи
Картофель	Вирус скручивания листьев картофеля
Картофель	Вирус Y картофеля
Картофель,	Вирус S картофеля
<i>Nicotiana debneyil</i>	
Картофель, табак	Вирус X картофеля
Рис	Вирус полосатости риса
Табак	Вирус мозаики резухи
Табак	Вирус мозаики сои
Табак	Вирус гравировки табака
Табак	Вирус полосатости табака
Табак	Вирус бронзовости томата
Табак, люцерна, томат	Вирус мозаики люцерны
Табак, огурец	Вирус мозаики огурца
Табак, <i>N. bethamiana</i>	Вирус погремковости табака
Табак, томат	Вирус табачной мозаики
Томат	Вирус мозаики томатов

По данным работы Fitchtn, Beachy, Annu. Microbiol.47:739-763, 1993.

Примеры продукции трансгенными растениями белков человека для возможного терапевтического применения

<i>Заболевания, синдромы</i>	<i>Растение – хозяин</i>	<i>Белки</i>	<i>Уровень экспрессии</i>	<i>Год опубликования</i>
1	2	3	4	5
Анемия	Табак	Эритропоэтин	< 0,01% СРБ ¹	1997
Передозировка наркотиков	Арабидопсис (резушка)	Энкефалины	0,10% белка семян	1997
Цирроз печени, ожоги, хирургические травмы	Табак	Сывороточный альбумин	0,02 % СРБ	1997
Кровопотеря	Табак	α-, β-глобин	0,05% белка семян	1997
Гиперкоагуляция	Табак Рапс	Протеин С Гирудин (ингибитор тромбина)	< 0,01% СРБ 0,03% белка семян	1999 1999
Вялое заживание ран	Табак	Эпидермальный фактор роста	< 0,01% СРБ	1999
Гепатиты А и В	Рис, репа Табак	α- Интерферон β-Интерферон	Нет данных < 0,01% СВ ²	1999
Нарушение синтеза коллагена	Табак	Гомотримерный коллаген	< 0,01% СВ	1999
Нейтропения	Табак	Гранулоцитмакрофагколониестимулирующий фактор	Нет данных < 0,01% СРБ	2000
Недостаток гормона роста	Табак	Соматотропин	Нет данных	2000
Пузырный фиброз, заболевания печени, кровотечения	Рис	α 1-Антитрипсин	Нет данных	2000
Предупреждение отторжения трансплантата	Кукуруза	Апротинин (ингибитор трипсина)	0,01% СРБ	2000
Бактериальные инфекции	Картофель	Лактоферрин		

¹СРБ-суммарный растворимый белок.

²СВ-сырой.

3. Культуры клеток и трансгенные животные

Сельскохозяйственные животные относятся к основному объекту приложения биологических технологий в области животноводства и ветеринарии. Естественный и искусственный отбор, селекция породистых животных, имеющие многовековую историю, актуальны и в настоящее время. К классическим методам улучшения породы животных относятся: криоконсервация семени высокопородистых, племенных самцов и искусственное осеменение самок; технология трансплантации эмбрионов внутри вида и межвидовая – химерные животные (от овцы – козе и др.).

Затем, благодаря технологии культивированных клеток и тканей животных *in vitro* культуры клеток животных стали самостоятельным объектом биотехнологии. Исследованиями Игла и сотрудников было показано, что для поддержания жизнедеятельности животных клеток *in vitro* необходимы 13 аминокислот. Живому, целому организму необходимы 8 незаменимых аминокислот (изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, треонин, триптофан, валин), а для изолированных культур клеток, их роста и размножения нужны еще 5 аминокислот (аргинин, глютамин, гистидин, тирозин, цистин). В составе питательной среды должны быть витамины, особенно групп В: никотинамид, тиамин, патентонат, пиридоксаль, рибофлавин, фолиевая кислота, никотиновая кислота, холин, инозитол, биотин – в качестве активных групп ферментов, участвующих в метаболизме клеток.

При получении культуры клеток кусочки животной ткани предварительно обрабатывают слабыми концентрациями протеолитических ферментов (чаще трипсином) с целью расщепления десмосом – белков межклеточного соединения. Затем суспензии клеток помещают в питательные среды Игла, 199 и др., имеющие вышеприведенный сложный состав, включая аминокислоты, витамины, соли, углеводы, факторы роста.

Культуры клеток и тканей животного происхождения используют с следующей целью:

– как биоматериал, используемый в трансплантологии;

– как биопродуценты физиологически активных соединений: интерферон, инсулин, гормон роста, интерлейкины, простогландины, лизоцим, комплемент и др. Кроме того, получают рекомбинантные белки (табл. 14);

– для культивирования вирусов при получении вакцин, диагностикумов и других вирусных препаратов;

– получение гибридных клеток, в том числе гибридом – продуцентов моноклональных антител.

Таблица 14

Характеристика культур рекомбинантных животных клеток – продуцентов биологически активных веществ (Н.В. Томилин, 1987)

Продукт	Реципиентные клетки	Источник вектора	Тип вектора	Выход продукта
1	2	3	4	5
β-Интерферон	Клетки яичника китайского хомячка	Вирус SV 40	Аmplифицируемый	(2?3)×10 ⁵ ед/мл сут
γ-Интерферон	То же	∥	∥	10 ⁶ ед/мл сут
	Фибробласты мыши	∥	Автономный	(3?4)×10 ⁵ ед/мл сут
Ростовой гормон человека	Клетки яичника		Интегративный	50мкг/млсут
Белок оболочки вируса гепатита в человека	То же	Вирус гепатита	Аmplифицируемый	2,5×10 ⁻⁶ мг/кл сут
То же	Фибробласты мыши	Ген металопониона	Автономный	10 мкг/мл сут
Ростовой гормон человека	∥	∥	∥	10 ⁻⁵ мкг/кл сут
Тканевой активатор плазминогена	Клетки яичника китайского хомячка	Аденовирус	Аmplифицируемый	До 5% от вновь синтезируемого белка
Белок онкогена с-тус	То же	Ген hsp 70	∥	До нескольких процентов от суммарного белка
Лютенизирующий гормон быка	∥	Вирус SV 40	∥	–

Преимущество использования животных клеток в качестве продуцента рекомбинантных белков в том, что при синтезе в эукариотных клетках осуществляется посттрансляционная модификация синтезируемых белков (гликозилирование и др.) и их экскреция в биологически активном состоянии, что порой проблематично достичь в бактериальных, прокариотных системах синтеза.

Вместе с тем технология поддержания жизнеспособности животных клеток *in vitro* значительно труднее, чем бактериальных культур. Наряду со сложностью состава питательных сред, сами животные клетки легко подвержены механическому повреждению при культивировании *in vitro*. Гибель клеток, присутствие в культуре клеточных остатков препятствуют достижению их высокой продуктивности, нарушают биотехнологический процесс.

Самостоятельным биологическим объектом являются гибридные клетки, получаемые путем слияния двух клеток в одну с общей цитоплазмой и единым ядром. Слияние клеток происходит в организме при его онтогенетическом развитии, оплодотворение женских и мужских половых клеток (ооцитов и сперматозоидов), происходит в результате слияния их мембран. Слияние клеток бластоцисты с клетками стенки матки матери обеспечивает имплантацию зародыша, формирование многоядерных мышечных трубочек, составляющих основу мышечной ткани, что также связано со слиянием одноядерных мышечных клеток. Слияние мембран возбудителей многих инфекционных болезней (вирусов, бактерий, хламидий) с клетками макроорганизма приводит к развитию патологических процессов. Слияют самые различные клетки животных: эмбриональные и зрелые, нормальные и злокачественные, способные и неспособные к делению и т.д. Гибриды соматических клеток используются при изучении фенотипических проявлений генов, картировании генома, механизмов клеточной дифференцировки и появления клеточного атипизма. Отдельным направлением применения гибридных клеток стала технология получения моноклональных антител, гибридомы – продуценты моноклонов. Для успешного слияния

двух клеток часто применяют вирус Сендай, полиэтиленгликоль, электрический потенциал.

Среди животных клеток в качестве биологического агента, как объект биотехнологии выделяют эмбриональные стволовые клетки (ЭСК). Различают 3 типа ЭСК:

- эмбриобласты предимплантационных зародышей млекопитающих. Именно их принято называть ЭСК;
- клетки эмбриональной карциномы;
- премордиальные половые клетки зародышей (ППКЗ).

Эмбриональные стволовые клетки тотипотентны, т.е. обладают неограниченными потенциями к дифференциации и способны реализовать генетическую информацию ядерных клеток, обеспечивая их дифференцирование, а также развитие до целого организма. Интенсивны исследования по экспрессии экзогенной ДНК в эмбриональные клетки путем ретровирусной трансфекции эмбрионов, микроинъекции ДНК в пронуклеус, использование трансгенной спермы в качестве вектора.

Трансгенные животные.

Основным объектом трансгенной технологии являются белые лабораторные мыши. Именно в их клетки, организм вводились чужеродные гены, ответственные за синтез новых белков (лекарственных средств), приводящие к тем или иным болезням (моделирование наследственной патологии человека). Путем трансгеноза можно внести «новую функцию» или, наоборот, вызвать «потерю функции».

Примером «потери функции» может быть направленная инактивация («нокаут») гена родопсина мыши, приводящая к инактивации палочек сетчатки, что имитирует такую болезнь человека, как пигментный ретинит.

Первые трансгенные мыши, несущие гены гормона роста были выращены в 1982 году. В отличие от обычных мышей у них в 4 раза была выше скорость роста, вес взрослых особей превышал в 2 раза норму. Но, к сожалению, у крупных сельскохозяйственных животных (овцы, свиньи, коровы) подобного эффекта при внедрении в их геном гена гормона роста не удалось

достичь. В 1980-х годах были получены первые трансгенные животные путем введения генов в оплодотворенные яйцеклетки. В ведущих биотехнологических центрах мира получено более 20 видов трансгенных животных: коровы, овцы, козы, кролики, продуцирующие такие биологические активные соединения как активатор плазминогена, моноклональные антитела, эритропоэтин, интерлейкин, антитрипсин и др. Чаще продуцируются вышеперечисленные соединения с молоком. Использование молочной железы в качестве «биореактора» обосновано тем, что молоко производится у сельскохозяйственных животных в достаточном количестве и дополнительная секреция нового белка не оказывает отрицательного действия на ее функциональное состояние.

V. СОХРАНЕНИЕ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ IN VITRO

Сохранение генофонда живых организмов, будь то редкие породы животных и птиц, линии и сорта растений, промышленно – ценные микроорганизмы, являющихся неотъемлемой частью природы всегда было и остается важной задачей биологической науки в целом. Живые клетки, как возобновляемый генетический материал всегда будут востребованы, особенно при появлении новых фундаментальных знаний, новых технологий.

В биотехнологии столь же важно сохранение и преумножение биологических ресурсов, создание новых биологических объектов, являющихся продуцентами веществ, востребованных в различных отраслях производства. Поддержание биологического объекта в рабочем состоянии, сохранение его продуцирующей активности – это основа, залог успешности биотехнологического производства.

Промышленные микроорганизмы, созданные путем селекции или генно-инженерной технологии менее стабильны, менее устойчивы нежели дикие штаммы, более легко подвержены реверсии, утрате или ослаблению полезных свойств; штаммы-сверхпродуценты нередко ауксотрофны. Поэтому промышленные микроорганизмы хранят, поддерживают их жизнеспособность и продуцирующие свойства в коллекциях. Обязанность коллекции – хранить микроорганизмы со всеми предосторожностями, необходимыми для поддержания их жизнеспособности и предупреждения загрязнения посторонней микрофлорой; хранить в течение определенного времени (до 30 лет согласно Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры; Будапешт, 28 апреля 1977 года). Коллекция – это специализированное научное подразделение, где не только сохраняются генетические ресурсы, но и обеспечиваются исследования фено- и генотипических характеристик ценных культур. Коллекции располагают условиями для скрининга различных микроорганизмов-продуцентов, для улучшения методов хранения, совершенствования

питательных сред, подбора криопротекторов и др. Коллекции ряда стран входят в формальные и неформальные объединения, создаваемые для сотрудничества, совместного выполнения научно-практических задач по сохранению и рациональному использованию генофонда. Учитывая, что биотехнология все больше базируется на молекулярно-генетических исследованиях, на ДНК-технологиях, возрастает роль банка генов, консервации самого носителя генетической информации – ДНК.

Коллекции генофонда культурных растений призваны заниматься сбором и всесторонним изучением растительных ресурсов (семена, посадочный материал и др.). Еще в 80-е годы прошлого столетия только в коллекции Всесоюзного НИИ растениеводства насчитывалось более 300 тыс. образцов исходного материала: видов и диких сородичей культурных растений (табл. 15).

Таблица 15

Состав мировой коллекции Всесоюзного научно – исследовательского института растениеводства им. Н.И. Вавилова (Муромцев Г.С. и др., 1990)

Культуры	Количество живых организмов		
	на 1 января		На 1 декабря 1989 г.
	1960 г.	1970 г.	
Зерновые (без кукурузы и крупяных культур)	34755	41311	102 990
Кукуруза и крупяные культуры	27 365	34021	45 942
Зернобобовые	17 003	22531	33 860
Технические и масличные	13 979	15966	20 559
Клубнеплоды, корнеплоды	2 822	5 417	10 422
Кормовые	12 976	10 970	17173
Овощные и бахчевые	16 631	17 563	37 040
Фруктовые, ягодные, субтропические, декоративные, виноград	18 234	32 903	31 282
Всего	143 765	180 682	299 268

Длительное культивирование, хранение клеток и тканей растений и животных *in vitro* также влияет на сохранение их изначальных признаков. В популяции растительных клеток могут иметь место нарушения митотического цикла с последующей перестройкой хромосом, изменения их числа (удвоение хромосом без деления клеток и ядра). Нарушения числа хромосом *in vitro* чаще наблюдаются в популяции каллусных клеток, а при длительном пассировании эти генетические изменения накапливаются, что в конечном итоге чревато потерей, изменением исходного полезного свойства. Для того чтобы сохранить *in vitro* сорт, линию и обеспечить селекционера в любое время генотипом, имеющим искомые признаки (необходимая пыльца для проведения гибридизации; уникальные и единичные семена; гибриды, трансформированные клетки растений; зиготические и соматические зародыши) существуют специальные методы хранения клеток и тканей *in vitro*. Аналогичные ситуации возникают и при сохранении эмбрионов, культуры клеток и тканей животных. Более того, культивирование тканевых клеток требует очень сложных по составу питательных сред (табл. 16, 17). Существует риск контаминации культивируемых животных клеток микоплазмами, вирусами.

Изначально для хранения и поддержания жизнеспособности культур клеток и тканей основным был метод пересевов. Так, аспорогенные бактерии пересеваются на свежие питательные среды 1-2 раза в месяц, спорогенные бактерии, актиномицеты, дрожжи и мицелиальные грибы – 1 раз в 2-3 месяца. При этом для пересева используются культуры в стационарной фазе роста, тогда они лучше переносят условия хранения *in vitro*. Также предпочтение отдается пересевам на плотные среды, хранению под вазелиновым маслом (слой 0,5-1 см), в темноте, при 5-20°C.

Растительные ткани поддерживаются в виде растущей коллекции путем периодического субклонирования пробирочных растений, оздоровленных методом культуры меристем. Период без пересадок (субклонирования) можно удлинить до 6-24 мес., сохраняя при 1-10°C и интенсивности освещения в 4000-5000 люкс.

Прописи основных синтетических питательных сред

<i>Ингредиенты мг/л</i>	<i>Основная среда изгла (ВМЕ) (модернизи- рованная) на р-ре Эрла</i>	<i>Основная среда изгла (ВМЕ) (модернизиро- ванная) на р-ре Хенкса</i>	<i>Среда изгла MEM (минимальная) на р-ре Эрла или Хенкса</i>
1	2	3	4
Аминокислоты:			
l-аргинин HCl	21.06	21.06	126.40
l-цистин	14.21	14.21	-
l-цистин 2H ₂ O	-	-	31.30
l-глутамин	292.3	292.3	292.3
l-гистидин HCl·H ₂ O	10.50	10.50	41.90
l-изолейцин	26.23	26.23	52.50
l-лейцин	26.23	26.23	52.50
l-лизин HCl	36.53	36.53	73.06
l-метионин	7.46	7.46	14.90
l-фенилаланин	16.51	16.51	33.02
l-треонин	23.82	23.82	47.64
l-триптофан	4.08	4.08	10.20
l-тирозин	22.51	22.51	36.22
l-валин	23.43	23.43	46.90
Витамины:			
биотин	1.00	1.00	-
D-Са пантотенат	1.00	1.00	1.00
солин хлорид	1.00	1.00	1.00
фолиевая кислота	1.00	1.00	1.00
i-инозитол	2.00	2.00	2.00
никотинамид	1.00	1.00	1.00
пуридоксал HCl	1.00	1.00	1.00
рибофлавин	0.10	0.10	0.10
тиамин HCl	1.00	1.00	1.00
неорганические соли:			
р-р Эрла			
CaCl ₂ ·2H ₂ O			265.0
KCl	264.9	-	400.0
MgCO ₄ ·7H ₂ O	400.0	-	200.0
NaCl	200.0	-	6800.0
NaHCO ₃	6800.0	-	1860.0
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	850.0	-	158.3
р-р Хенкса			
CaCl ₂ ·H ₂ O		185.5	185.5
KCl	-	400.0	400.0
KH ₂ PO ₄	-	60.0	60.0
MgCO ₄ ·7H ₂ O	-	200.0	200.0
NaCl	-	8000.0	8000.0
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	-	-	60.0

1	2	3	4
NaHCO ₃	-	47.50	350.0
D(+)-глюкоза x H ₂ O	-	-	1100.0
D- глюкоза	1000	1000	-
Феноловый красный	17.0	17.0	10.6
Сукциновая к-та	17.0	17.0	-
Аминокислоты:			
l-аргинин HCl	84.0	70.0	211.0
l-аргинин	-	-	-
l-цистин 2HCl	62.57	26.069	-
l-цистеин HClxH ₂ O	0.11	-	-
l-цистеин 2HCl	-	-	31.5
l-глутамин	584.0	100.0	146.2
Глицин	30.0	50.0	7.51
l-гистидин HCl H ₂ O	42.0	21.88	21.06.
l-изолейцин	104.8	20.0	06 2.6
l-лейцин	104.8	60.0	13.1
l-лизин HCl	146.2	70.0	29.3
l-метионин	30.0	15.0	4.48
l-фенилаланин	66.0	25.0	4.95
l-серии	42.2	25.0	10.50
l-треонин	95.2	30.0	3.57
l-триптофан	16.0	10.0	0.60
l-тирозин	72.0	40.0	1.81
l-валин	93.6	25.0	3.5
l-аланин	-	25.0	8.91
аспарагиновая к-та	-	30.0	13.3
глутаминовая к-та	-	66.82	14.7
l-гидроксипролин	-	10.0	-
l-пролин	-	40.0	11.50
l-аспарагин	-	-	15.0
l-аспарагин H ₂ O	-	-	-
Глютацин	-	-	-
Витамины:			
D-биотин	-	-	-
Ca-D(+)-пантотенат	4.0	0.01	0.024
солинхлорид	4.0	0.01	0.715
фолиевая кислота	4.0	0.05	0.698
мезо-инозит	7.0	0.01	1.32
никотиновая к-та	4.0	0.05	0.541
пиродоксал HCl	4.0	0.025	0.615
пиродоксин HCl	-	0.025	-
рибофлавин	0.4	-	0.376
тиамин HCl	4.0	0.01	0.376
l-аскорбиновая к-та	-	0.01	1.012
Кальциферол (вит.Д)	-	0.5	-
Глютатион	-	0.1	-

	1	2	3	4
Менадион-Na-бисульфит	-	-	0.05	-
P-аминобензоат. к-та	-	-	0.05	-
вит. А	-	-	0.05	-
DL-α-токоферолфосфат	-	-	1.1147	-
вит. В	-	-	0.01	-
D(+)-глюкоза Н ₂ О	1100.0	-	1100.0	1.36
Na-пируват	110.0	-	-	1210.0
аденинсульфат	-	-	10.0	110.0

Таблица 17

Наиболее широко используемые питательные среды

<i>Питательная среда</i>	<i>Особенности состава и применение</i>
Среда 199	Широко используемая многокомпонентная среда, оригинально предназначалась и использовалась для производства полиовируса. Рекомендуется для применения в диагностике вирусных инфекций.
Основная среда Игла, ВМЕ	Обычно используемая среда с минимальным набором аминокислот и витаминов. Оригинально предназначалась для культивирования клеток HeLa, KB и т.п.
Основная среда Игла для культивирования диплоидных клеток, ВМЕ диплоид	По сравнению с ВМЕ MgSO ₄ заменен на MgCl ₂ , удален i-инозитол.
Минимальная среда Игла MEM	По сравнению с ВМЕ в 2 раза увеличено содержание аргинина, в 4 раза гистидина, двукратный набор остальных аминокислот, кроме глутамина, удален биотин. Используется для культивирования большинства перевиваемых линий клеток с повышенными требованиями к составу питательной среды. Позволяет поддерживать культуры длительное время без подкормки.

Но традиционные методы хранения (пересевы микроорганизмов и субклонирование пробирочных растений) имеют определенные недостатки. При температуре 0-4°C деление клеток может продолжаться, частые пересевы приводят неминуемо к нежелательным мутациям, существует риск контаминации посторонней микрофлорой, возможно снижение продуктивности культуры (после каждого посева необходим скрининг на функциональную активность штамма).

В состоянии анабиоза, при почти полном прекращении обменных процессов могут находиться микроорганизмы, изолированные клетки и ткани животных и растений. В основе анабиотического состояния – обезвоживание клетки. Поэтому наиболее оптимальны для длительного хранения клеток без утраты ценных свойств методы, позволяющие резко затормозить протекающие в них метаболические процессы, в том числе и генетические перестройки – это лиофилизация и криоконсервация.

Ллиофилизация – это обезвоживание предварительно замороженных клеток под вакуумом, когда внутриклеточная вода из твердого состояния переходит в газообразное, минуя жидкую фазу в условиях низкой температуры. Ллиофильная сушка используется при хранении бактерий, актиномицетов, микоплазм, мицелиальных грибов, дрожжей, водорослей, простейших, вирусов, вакцин, плазмы крови. При лиофилизации живые клетки подвергаются замораживанию, высушиванию и регидратации а затем они хранятся в запаенных ампулах или флаконах под вакуумом либо в присутствии инертного газа в холодильниках при 4-6°C, в темноте; остаточная влажность лиофилизированных клеток равна 2-6%. Необходимо отметить, что культуры в ампулах или флаконах замораживаются до -40 -60°C, а затем подвергаются высушиванию при пониженном атмосферном давлении, под вакуумом, когда внутри – и внеклеточная вода вымерзает, испаряется. Такой метод позволяет максимально сохранить клеточную и внутриклеточные мембраны от механического повреждения кристаллами льда, от перепада осмотического градиента между внутри – и внеклеточной средой.

При лиофилизации для защиты клеток от повреждений при выходе воды, для стабилизации мембранных структур используются защитные среды – растворы сывороток, сахарозы, желатина, обезжиренное молоко. Культуры микроорганизмов на лиофилизацию берутся в конце экспоненциальной фазы роста. Технологический режим лиофилизации различен для разных биологических объектов, оптимальные условия программируются для каждой группы микроорганизмов, культур клеток, тканей животных и растений.

Криоконсервация (*kryes* – мороз, лед) – это длительное хранение биологических объектов в жизнеспособном состоянии путем их глубокого замораживания и последующего хранения в жидком азоте (-196°C) или в его парах (-150°C). Криоконсервация практически полностью предотвращает «порчу» генного фонда популяции клеток, реализуя состояние анабиоза. Этим методом хранятся цианобактерии, пурпурные и зеленые водоросли, мицелиальные грибы, актиномицеты, растительные и животные клетки, гибридомы, генетически модифицированные клетки.

Создание криобанков, пожалуй, является одним из оптимальных способов сохранения генофонда редких и исчезающих видов животных и растений. В настоящее время глубокое замораживание клеток, тканей и органов получило широкое распространение в медицине и животноводстве; иначе с растениями. Растительные клетки, имеющие большие размеры, большие вакуоли и много воды, сильнее повреждаются при замораживании и последующем оттаивании. Поэтому легче криоконсервировать мелкие меристематические клетки, подсушенную пыльцу.

Процесс криоконсервации включает следующие этапы: подготовка культуры клеток, внесение криопротектора, программное замораживание и хранение в жидком азоте, быстрое оттаивание, удаление криопротектора, рекультивирование микроорганизмов или регенерация растений (рис. 17). Этап подготовки культуры – это культивирование на питательных средах, содержащих различные осмотически активные вещества (маннит или

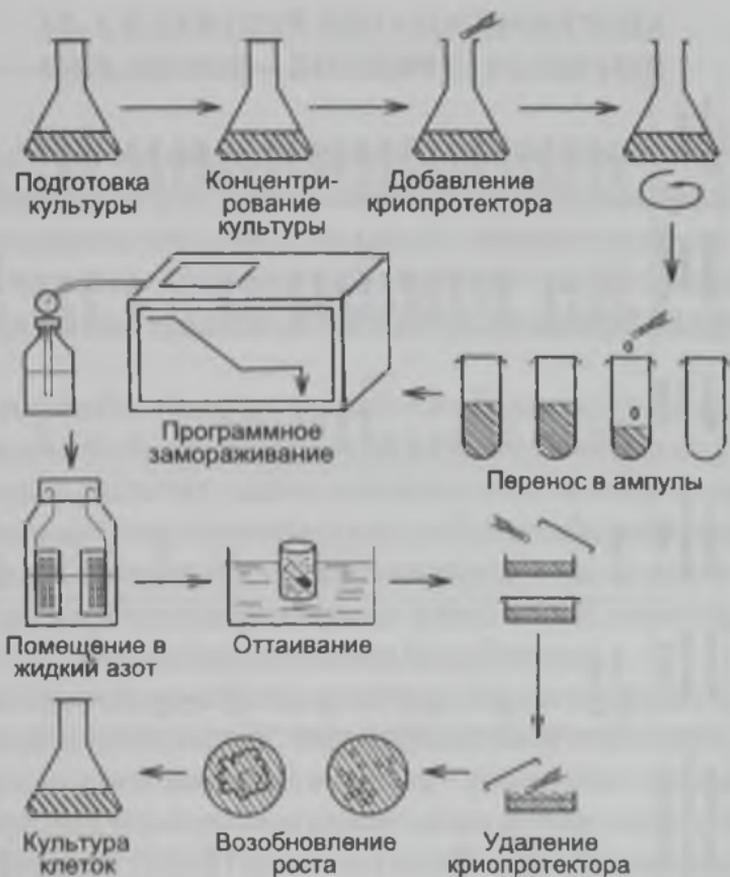


Рис. 17. Этапы криосохранения культуры клеток
(Г.Ж. Валиханова, 1996)

сорбит, 2-6%), аминокислоты (чаще пролин, хорошо связывающий воду в клетках). Криопротекторы – это вещества которые снижают точку заморзания, связывают внутриклеточную воду и защищают клетки от механического и осмотического стресса. К ним относятся: диметилсульфоксид (ДМСО) 5-10%, глицерин 10-20%, поливинилпирролидон (ПВП), декстран, полиэтиленгликоль (ПЭГ) с молекулярной массой 6000.

Таким образом для длительного сохранения клеток микробного, растительного и животного происхождения наиболее адекватны и широко применяются лиофильная сушка и криоконсервация; метод пересевов используется чаще для рабочих коллекций при кратковременном хранении биоматериала (табл. 18).

Продолжительность хранения некоторых микроорганизмов различными методами

Род микроорганизма	Периодичность пересевов	Минеральное масло	Стерильные: лочва-а, песок-б, сытка-г, в-в	1%-ный раствор NaCl	Дистиллированная вода	Низкие температуры	Жидкий азот (-196°C)	Лиофилизация
Бактерии								
Acetobacter	1-2 мес	9-12 мес	4 г*	6-12 мес	6-12 мес	3-4 г	30 лет	30 лет
Actinomyces	1-2 мес	8 лет	4 г*	3-6 лет		2-3 г	30 лет	30 лет
Agrobacterium	1-2 мес	1-2 г	1-2 г*		3 г	3 г	30 лет	30 лет
Anthrobacter	1-2 мес	4-5 лет				4 г	30 лет	30 лет
Azotobacter	1-2 мес	5-7 лет	10 лет*					20 лет
Bacillus	2-12 мес	4-7 лет	10 лет*	2 г	2 г	2-3 г	30 лет	30 лет
Chromatium	1 мес						10 лет	20 лет
Clostridium	6-12 мес	1-2 мес	30 лет*			2-3 г	30 лет	30 лет
Escherichia	1-4 мес	2 г		2 г	1 г	4 г	30 лет	30 лет
Gluconobacter	1 мес	2 г		1 г	2 г	4 г	30 лет	30 лет
Lactobacillus	20 сут	8 мес				4 г	30 лет	30 лет
Methanobacterium	1 мес					20 мес	10 лет	10 лет
Methanomonas	1 мес					20 мес	10 лет	10 лет
Mycobacterium	2 мес	4-5 лет		3 г	4 г	5 лет	30 лет	20 лет
Nocardia	1-4 мес	1 г				1-2 г	30 лет	20 лет
Propionibacterium	1 мес	4-5 лет						20 лет
Protus	1-2 мес	2 г				1-2 г	30 лет	30 лет
Pseudomonas	1-3 мес	5-6 лет		1-2 г	1-2 г	5 лет	30 лет	30 лет
Rhizobium	1-2 мес	5 лет	30 лет*					20 лет
Rhodococcus	2 мес	4-5 лет		1 г	1 г	4 г		20 лет
Serratia	2 мес	2 г		2 г	6-7 лет			20 лет
Spirillum	Еженедельно	6 мес				1 г	30 лет	30 лет
Staphylococcus	1-2 мес							
Streptococcus	1-2 мес	3 г	1 г*			4 г	30 лет	30 лет
Streptomyces	1-8 мес	1-3 г	1 г*			4 г	30 лет	30 лет
Дрожжи		6-8 лет	2-3 г*	3 г		1-3 г	30 лет	30 лет
Candida	4-6 мес	4-6 лет	10 лет*		2-4 г	2 г	>5 лет*	30 лет
Saccharomyces	4-6 мес	1-6 лет	10 лет*		2 г	3-20 лет	>5 лет*	30 лет
Мицелиальные грибы								
Aspergillus	4-6 мес	3-4 г	10-20 лет*	2-3 г	2-3 г	2-5 лет	>10 лет*	18 лет
penicillium	4-6 мес	2-3 г	10-20 лет*	2-3 г	2-3 г	2-5 лет	>10 лет*	18 лет

VI. СЕЛЕКЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ – БИОПРОДУЦЕНТОВ

Разработка и совершенствование биологического объекта, основополагается на едином методологическом принципе – внесение изменений в генотип клетки, независимо будь то животный организм, растение либо культура микроорганизмов, используется он в традиционной и нетрадиционной биотехнологии.

В истории биотехнологии работа с биологическими объектами начиналась с совершенствования имеющегося (дикие-культурные растения, дикие-сельскохозяйственные животные, почвенные микроорганизмы-продуценты антибиотиков, витаминов и др.). Сейчас актуально в биотехнологии создание модифицированных микроорганизмов, трансгенных животных и растений, т.е. принципиально новых биообъектов.

Генетические изменения в клетках биологических объектов могут иметь спонтанный, индуцированный генез либо возникать в результате внесения в клетку – реципиент конкретного гена (генов) с известными свойствами путем технологии рекомбинантной ДНК. При этом генетические изменения могут носить внутривидовой, межвидовой характер; более того, гены эукариотной клетки могут быть привнесены в геном прокариот и наоборот. В целом как при традиционной селекции, так и технологии рекомбинантной ДНК речь идет о перераспределении между организмами имеющегося в природе либо синтезированного генетического материала.

1. Селекция промышленных микроорганизмов

Селекция – это отбор среди популяций микроорганизмов штаммов, превосходящих остальные по полезным биологическим свойствам, усилившимся либо появившимся вследствие изменения нуклеотидной последовательности ДНК (рис. 18).

Сознательная работа с микроорганизмами, обладающими полезными свойствами, селекция промышленных микроорганизмов не имеют тысячелетнюю историю, в отличие от селекции

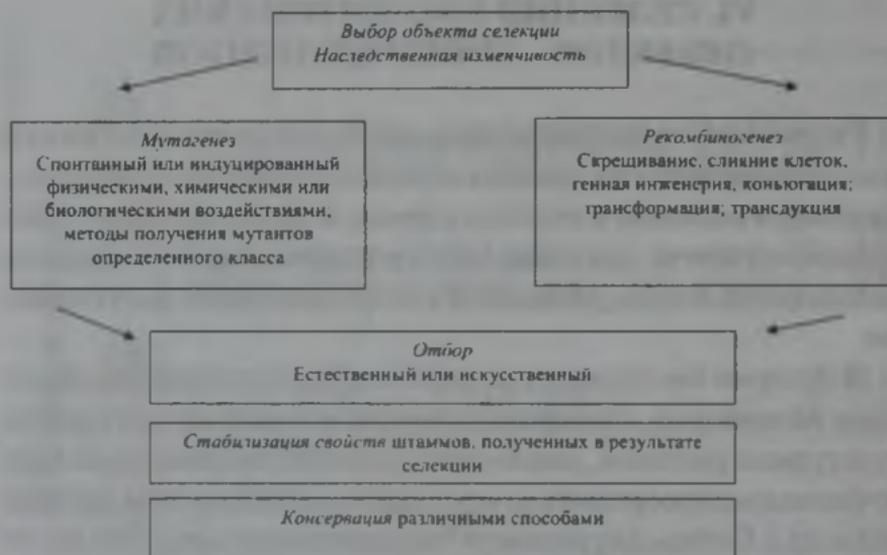


Рис. 18. Схема селекции микроорганизмов.

сельскохозяйственных пород животных, культурных и декоративных растений. Сами микроорганизмы открыты и изучены не столь давно.

Селекция – это постоянный поиск, путь от интуитивного отбора штаммов – продуцентов по их фенотипическим проявлениям до конструирования молекул ДНК, создания модифицированных микроорганизмов (технология рекомбинантной ДНК).

Селекция – это путь от увеличения продукции полезного метаболита, свойственного данному виду микроорганизма (синтез ферментов, антибиотиков, аминокислот и др.) до программируемого исследователем синтеза (технология рекомбинантной ДНК) таких биологически активных веществ, которые не свойственны микроорганизмам (*E. coli* – продуцент инсулина, интерферона и др.).

Селекцию проводят среди штаммов микроорганизмов, выделенных из различных природных источников, среди производственных штаммов, среди коллекционных культур.

Несмотря на быстрый рост и размножение микроорганизмов, спонтанные мутации в популяции наблюдаются довольно редко: пары азотистых оснований (гуанин – цитозин, аденин –

тимин) подвержены изменению примерно в одном случае на сто миллионов репликаций.

Индукцированный мутагенез значительно эффективнее, частота мутаций возрастает на 2-4 порядка в сравнение со спонтанными мутациями.

В качестве мутагенных факторов, способных вносить изменения в исходную ДНК путем взаимодействия с азотистыми основаниями или воздействия на репликацию ДНК и вызывать индуцированный мутагенез применяются (табл. 19):

- ◆ УФО, рентген, гамма – лучи, нейтроны и др.;
- ◆ Химические соединения: этиленимин, азотистый иприт, 5-бромурацил, 2-аминопурин и др.;
- ◆ Бактериофаги как биологический мутагенный фактор.

В селекционном процессе доминирует ступенчатый, последовательный, поэтапный во времени отбор на фоне воздействия одного либо нескольких мутагенов. Например, продуцент пенициллина *Penicillium chrysogenum* в течении нескольких десятков лет селекционной работы увеличил продуцирующую активность более чем в десять тысяч раз; продукция рибофлавина дрожжами *Eremothecium ashbyi* возросла в две тысячи раз.

Успешное использование селекционных методов позволило достаточно быстро получить сверхпродуценты из рода *Streptomyces*, увеличить количество штаммов микроорганизмов, уцирующих антибиотики в десятки раз больше, чем исходная культура. Именно при изучении синтеза пенициллина, в процессе селекции продуцентов антибиотиков были разработаны основы современной селекционной технологии промышленно-ценных микроорганизмов.

Наряду с применением при селекции только одного мутагенного фактора, возможно использование нескольких мутагенов. Так, продуцент стрептомицина – *Streptomyces griseus* синтезирует антибиотик в количестве 250 ед/мл. Воздействием УФ – лучей селекционирован мутант, продуцирующий 2000 ед/мл, при последующем мутировании штамма этиленимином – 3000 ед/мл. А при совместном воздействии химическим и физическим мутагеном продуцирующая способность *Streptomyces griseus* возросла до 15-20 тыс. ед/мл.

Группы мутагенов, используемых для индукции мутаций у микроорганизмов

Мутаген	Механизм действия	Тип мутации	Эффективность	Особенности и недостатки
<p><i>Радиация</i> Рентгеновское излучение, быстрые нейтроны УФ-облучение</p>	<p>Преимущественно разрывы хромосом Димеризация пиримидинов Ошибки в репликации ДНК</p>	<p>Делеции, инверсии транзиции, трансверсии, делеции Транзиции</p>	<p>Высокая Средняя</p>	<p>Требует специального оборудования Мутаген широкого спектра действия</p>
<p><i>Химические агенты</i> 2-аминопурин, 5-бромдезоксиридия гидроксиламин азотистая кислота нитрозогуанидин (НГ)</p>	<p>Деаминарование цитозина Деаминарование цитозина и аденина</p>	<p>Транзиции, делеции</p>	<p>Низкая Средняя</p>	<p>Относительно низкая эффективность Высокая частота мутаций только в условиях низкой выживаемости</p>
<p>Этилметансульфонат (ЭМС) Акридиновые красители, этидия бромид, соединения тила ICR</p>	<p>Алкилирование оснований в репликативной вилке</p>	<p>Транзиции, трансверсии, делеции с низкой частотой</p>	<p>Очень высокая</p>	<p>Высокая мутагенность при низкой летальности, множественные мутации</p>
<p><i>Биологические агенты:</i> Гены-мутаторы</p>	<p>Алкилирование гуанина Интеркаляция между основаниями во время репликации то же</p>	<p>Транзиции и трансверсии Мутации со сдвигом рамки считывания, небольшие вставки и делеции</p>	<p>Средняя Низкая Высокая</p>	<p>По сравнению с ИГ меньше множественных мутаций Эффективны при излечивании клеток от плазмид</p>
<p>Транспозоны (Tn5, Tn10, Tn917) и др.</p>	<p>Нарушение процессов репарации и репликации ДНК</p>	<p>Мутации со сдвигом рамки считывания, небольшие вставки и делеции</p>	<p>Средняя</p>	<p>Соединение, которое трудно достать. Требуют конструирования штаммов. Повышают частоту мутаций при обработке алкилирующими агентами</p>
<p><i>Спонтанные мутации</i></p>	<p>Встраивание в ДНК Воздействие на ДНК факторов внешней среды и интермедната клеточного метаболизма</p>	<p>Вставки, делеции, инверсии Транзиции, трансверсии, делеции, вставки</p>	<p>Очень высокая Очень низкая</p>	<p>Требуют конструирования штаммов. Повышают частоту мутаций при обработке алкилирующими агентами Возможность прямой селекции мутаций. Требуют создания векторов Широкий спектр мутаций (обычно одиночные)</p>

Ступенчатый отбор мутантов имеет место при селекции продуцентов органических кислот. Так, музейная культура *Aspergillus niger* поэтапно была подвержена воздействию этиленимина, УФ – лучей, нитрозометилмочевины и гамма лучей, в итоге был получен штамм – сверхпродуцент.

Сложнее увеличить синтез ферментов, так как они являются белками, их метаболизм регулируется несколькими механизмами внутри клетки. Тем не менее, благодаря индивидуальному мутагенезу были получены штаммы *Aspergillus oryzae* (α -амилаза) и *Aspergillus awamori* (глюкоамилаза) во много раз больше синтезирующие искомые ферменты, нежели исходные музейные культуры.

Сверхпродуцирующая активность селекционированных мутантов связана со следующими механизмами:

- ◆ Повышение активности ферментов, участвующих в синтезе искомого метаболита;
- ◆ Состояние депрессии (подавление аллостерической регуляции) по данному метаболиту или блокирование ингибирования по типу обратной связи;
- ◆ Повышенная клеточная и цитоплазматическая проницаемость для сверхпродуцируемого метаболита;
- ◆ Изменение регуляторных механизмов метаболических процессов в клетке (фосфорного метаболизма, дыхательной системы и др.).

Промышленные микроорганизмы селекционируют чаще из ауксотрофных мутантов, а не среди прототрофов.

Концентрация синтезируемых в клетке метаболитов регулируется по типу обратной связи, так называемый негативный контроль: чем больше искомого метаболита накапливается внутри клетки, тем сильнее проявляется действие внутриклеточных ингибирующих механизмов или вовсе подавляется синтез данного метаболита. Если же клетка-мутант находится в состоянии депрессии по данному метаболиту, то синтез последнего даже в количествах, во много превышающих ее потребности не ингибируется, т.е. имеет место сверхпродукция.

Суть дерепрессии в том, что устраняется механизм подавления активности ферментов, участвующих в биосинтезе по типу обратной связи (аллостерическая регуляция), продолжается синтез фермента и, естественно, искомого метаболита.

Более скорое удаление метаболита из клетки за счет избирательного повышения проницаемости клеточной стенки, цитоплазматической мембраны также способствуют поддержанию данной метаболической активности.

Несмотря на определенные преимущества селекция микроорганизмов в отличие от высших организмов (это быстрая смена поколений, несложность выделения желаемого клона микроорганизмов, отсутствие в большинстве случаев скрытой изменчивости в силу гаплоидности генома), проблема сохранения специфической активности мутанта достаточно сложна. Для стабильного поддержания биопroduцирующей активности промышленного штамма приходится регулярно клонировать и отбирать из популяции микроорганизмы, отличающиеся специфичностью синтеза, высокой продуктивностью и устойчивостью в культуральной среде.

Существуют различные варианты мутаций, приводящих к улучшению производственных характеристик промышленных микроорганизмов.

На примере синтеза лизина, являющегося незаменимой аминокислотой в рационе животных приводятся различные варианты мутаций для достижения сверхпродукции данного метаболита. *Corynebacterium glutamicum* превращает в лизин более трети находящегося в среде культивирования углеводов, вырабатывая около 70 г лизина на 1 л питательной среды. Лизин является конечным метаболитом одного из путей обмена веществ в микробной клетке, пути общего для трех аминокислот – лизина, метионина и треонина. Регулируется синтез этих аминокислот в бактериальной клетке по типу обратной связи. Когда концентрация двух аминокислот – треонина и лизина превышает потребности микроорганизма, то происходит ингибирование фермента аспартаткиназы, участвующей в биосинтезе. Накопление в клетке избыточного количества треонина и лизи-

на ингибирует аспарататкиназу, а нехватка этих двух аминокислот активирует фермент, увеличивает скорость его синтеза.

Сверхсинтез лизина был осуществлен благодаря селекции мутантов двух типов. У мутанта первого типа из-за мутации гена, ответственного за синтез гомосериндегидрогеназы произошла утрата активности этого фермента, в результате в мутантной клетке вообще прекратился синтез метионина и одного из ингибиторов аспарататкиназы – треонина. Мутировавший микроорганизм смог расти только при внесении в питательную среду метионина и треонина. При внесении этих аминокислот в малой дозе, достаточной только лишь для роста и размножения микробных клеток, но недостаточной для того чтобы треонин совместно с лизином подавлял активность аспарататкиназы ингибирования не будет.

Лизин будет продуцироваться в избыточном количестве, но внесенного в питательную среду треонина будет не хватать для их совместного ингибирования аспарататкиназы. Этот мутант ауксотрофен по метионину и треонину.

У мутанта второго типа имела место мутация гена, ответственного за синтез самой аспарататкиназы. В результате фермент «утратил» чувствительность к изменению концентрации лизина, поэтому ингибирование по типу обратной связи отсутствует.

В селекции сверхпродуцентов наряду с мутациями применяется технология рекомбинаций-перераспределения генов между микроорганизмами. При переносе генов не между близкородственными, а между микроорганизмами разных видов чаще используются протопласты. Перенос генетического материала чаще осуществляется при помощи плазмид и бактериофагов. К примеру, один из способов рекомбинации-гибридизация используется при селекции дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, используемых в производстве этанола. У этих дрожжей нет фермента мелибиазы, гидролизующей раффинозу, углевод, содержащийся в субстрате брожения – патоке. Для того, чтобы *Saccharomyces cerevisiae* утилизировал этот углевод была проведена гибридизация (скрещивание) этих микроорганизмов с пивными дрожжами вида *Saccharomyces carlsbergensis*, сбразивающими раффинозу. Селекционированный му-

тант – гибрид приобрел свойства обеих родительских микроорганизмов, т.е. более полно утилизировал патоку.

Возможны и другие подходы в селекции гибридов. Так, штамм пивных дрожжей *S. carlsbergensis*, сбраживающий сахарозу и мальтозу был гибридизирован с культурой дрожжей *Saccharomyces globosus*, неспособной утилизировать эти углеводы. В результате селекции был получен мутант, который ассимилировал только мальтозу. Этот гибрид используется при производстве так называемого «бархатного» пива (с несброженной сахарозой в составе).

Таким образом, используя различные методы селекционируются промышленно-ценные штаммы микроорганизмов; стабилизируются полученные свойства штаммов; штаммы-продуценты консервируются различными способами.

2. Селекция в растениеводстве

Окультуривание диких растений, использование их в повседневной хозяйственной деятельности известно с незапамятных времен. Отбор сельскохозяйственных растений по урожайности, по качеству семян и другим свойствам осуществлялся эмпирически, исходя из практического опыта. Так появлялись местные сорта растений, сортовое семеноводство, формировались питомники растений. В последующем была освоена селекция, основанная на скрещивании новых сортов с местными, в результате получали растения с высокими продовольственными характеристиками и в то же время адаптированные к местным погодно-климатическим условиям (пшеница, просо, кукуруза и др.). Ввоз новых сортов на другие территории (интродукция, introduction - введение) также широко используется в растениеводстве. Естественно, результаты селекционной работы успешно реализовались только при соблюдении агротехнологии.

Успешность селекции, как известно, зависит от генетического многообразия исходного материала. К примеру в мире насчитываются тысячи образцов пшеницы, более 200 видов картофеля и т.д. Наиболее существенное изменение генотипа растений имеет место при межвидовом или межродовом скрещива-

нии, т.е. при отдаленной гибридизации. Однако механизмы, пути скрещивания в естественных природных условиях, являющиеся, по-сути, внутривидовым скрещиванием (самоопыление и перекрестное опыление рыльца, черенкование, привой и др.) зачастую не эффективны при отдаленной гибридизации.

Преодолеть эти мегодические трудности позволяет клеточная селекция *in vitro*, используя суспензионную культуру клеток, протопласты либо тканевую культуру (чаще культуру каллусной ткани) на фоне воздействия мутагенных, стрессовых (абиотических и биотических) факторов.

В селекционной практике часто применяются дополнительные технологии, предворяющие саму селекцию, технологии, создающие генетическое разнообразие, приводящие к генетической изменчивости, клональному разнообразию исходного материала.

К дополнительным технологиям относятся:

♦ Преодоление прогамной (1) и преодоление постгамной (2) несовместимости скрещиваемых культур.

1. Оплодотворение *in vitro* (культивирование *in vitro* пыльцы и неоплодотворенных семязпочек). В естественных условиях этого не происходит из-за неспособности пыльцы прорасти на рыльцах, невозможности пыльцы достигнуть семязпочек;

2. Культура незрелых гибридных семязпочек и зародышей (эмбриокультура). Эта технология позволяет сохранить жизнеспособность зародышей межвидовых и межродовых гибридов, т.е. эмбрионы, полученные путем отдаленной гибридизации. Проращивание изолированных зародышей *in vitro* позволяет получить растение. В естественных условиях такой зародыш обычно погибает.

Ускорить селекционный процесс можно применяя и такую дополнительную технологию, как создание и использование гаплоидов. Существует несколько методов получения гаплоидов из культур тканей:

– андрогенез или получение гаплоидных растений на искусственной питательной среде из изолированных пыльников и микроспор;

- гиногенез или получение гаплоидных растений на искусственной питательной среде из изолированных семязпочек;
- партеногенез или получение гаплоидов из гибридного зародыша, у которого из-за несовместимости хромосом родителей потеряны отцовские хромосомы.

Преимущества гаплоидного растения в следующем:

- одинарный набор хромосом позволяет легко выявить мутацию в отличие от диплоидных растений, где в случае рецессивности гена фенотипически мутации не проявляются;
- получение из гаплоидных клеток гомозиготного растения с удвоенным числом хромосом.

После дополнительной обработки регенератов колхицином возникают абсолютно гомозиготные дигаплоидные растения.

Селекция растительных клеток как и микроорганизмов основывается на мутациях и рекомбинациях. Первые возникают под действием стрессовых (абиотических и биотических) факторов, вторые – результат межвидового и межродового обмена генетической информацией.

Различают прямую селекцию, заключающуюся в том, что культивирование проводится в питательной среде, содержащей стрессовый селективный фактор (антибиотик, токсин фитопатогена, повышенная концентрация соли и др.) с последующим отбором устойчивых клонов. Это наиболее распространенная технология селекции устойчивых к стрессовым факторам сортов или линий растений (рис. 19).

Непрямая или негативная селекция – при культивировании в среде, содержащей аналог азотистого основания (к примеру, тимидин) исходные клетки размножаются, а мутировавшие нет. При размножении исходных клеток (дикий тип растения) аналог тимидина, встраивается в реплицирующуюся ДНК, прекращает этот процесс и клетки погибают. А мутант сохраняет жизнеспособность и после пересева на среду, не содержащую аналог азотистого основания размножается.

В качестве объекта клеточной селекции применяются каллусные клетки, суспензионные культуры клеток и изолированные протопласты. Преимущества использования в селекции

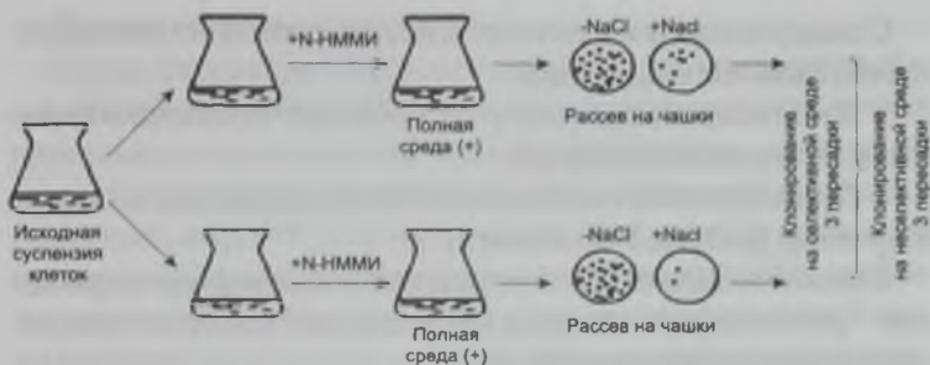


Рис. 19. Схема эксперимента по клеточной селекции на устойчивость к высоким концентрациям NaCl.

технологии культивирования соматических клеток и изолированных протопластов *in vitro* в том, что возможно получение множества генетически различающихся клонов, минуя половой процесс путем соматической гибридизации. Затем сразу же отбирать и стабилизировать ценные клоны опять же *in vitro*.

Для получения устойчивых линий растений – регенерантов в селекционной практике проводится неоднократное повторное субкультивирование на селективных и неселективных средах и только затем осуществляется отбор. И все же в конечном итоге закрепить результаты клеточной селекции необходимо в полевых условиях, т.е. путем традиционной технологии.

Столь же широко применяется технология гибридизации соматических клеток, т.е. перераспределение генов между растительными клетками и получение гибрида. Слияние изолированных протопластов, полученных из соматических клеток позволяет скрещивать растительные клетки различных видов и родов, скрещивать филогенетически отдаленные виды, которое в естественных условиях практически неосуществимо, т.е. соматическая гибридизация – это технология, позволяющая *in vitro* преодолевать определенные межтканевые барьеры и получать гибридные растения.

Основой создания новых сортов и линий культурных и декоративных растений является наличие генетического разнообразия исходного материала.

Соматональная изменчивость клеток, растений – регенерантов обусловлена следующим:

- ◆ Культивирование *in vitro* способствует появлению фенотипических изменений;
- ◆ Применение мутагенов (химические соединения, гамма-излучение, рентген, УФ-лучи и др.).

В целом соматоналы или соматональные варианты растений – регенерантов значимы как исходный материал при селекции новых сортов растений.

3. Селекция в животноводстве

Скрещивание и отбор

Выведение местных пород крупного рогатого скота, коров с высокими удоями молока, тонкорунных овец, яйценоских кур, арабских скакунов и т.п., требует длительной и кропотливой работы по скрещиванию и отбору лучших по требуемым качествам животных. Таким путем формируются породистые линии сельскохозяйственных животных. Несмотря на длительность времени получения высокопородистых линий животных и существенность материальных затрат, скрещивание и отбор, используемые при этой технологии остаются основой селекции в животноводстве.

Гормональная регуляция

С середины прошлого столетия в животноводстве очень интенсивно стали применяться гормоны гипофиза, гипоталамуса, половые гормоны для активной регуляции полового цикла, синхронизации половой охоты и овуляции, сокращения срока искусственного осеменения.

У обработанных гормональными препаратами животных искусственное осеменение приводит к более высокому проценту оплодотворения, большему поголовью потомства, повышает продуктивность животных. Данная технология достаточно широко и эффективно используется в сельскохозяйственном животноводстве.

Трансплантация эмбрионов

Криоконсервация семени высокопородистых животных-самцов и искусственное осеменение самок позволяют получать несколько тысяч потомков от одного животного – производителя. Но при этом остается низким продуктивность высокопородистых самок. От оплодотворения до появления потомства проходит длительный срок, число потомства невелико, особенно у крупного рогатого скота. Но если у высокопородистой самки после искусственного осеменения и оплодотворения извлекать эмбрион на очень ранней стадии развития, затем проверив его на жизнеспособность и физиологические параметры имплантировать менее ценным самкам для последующего вынашивания и получения потомства, то таким путем от породистой самки можно получить много больше породистых телят, ягнят, жеребят, поросят и др.

Оплодотворение яйцеклеток вне организма животных

Эта технология на сегодняшний день применяется только в крупных научных лабораториях из-за сложности извлечения жизнеспособных яйцеклеток у самок-доноров, оплодотворения яйцеклеток спермой в пробирочных условиях, *in vitro* и последующей имплантации эмбриона на ранней стадии развития самке-реципиенту.

Технологии трансплантации эмбрионов и оплодотворение яйцеклеток *in vitro* наиболее часто используются при размножении высокопородистых линий сельскохозяйственных животных. Благодаря отработанности методов извлечения, поддержания и имплантации эмбрионов результаты данных технологий рентабельны.

Клонирование животных

В 1977 году была клонирована овца по имени Долли путем пересадки ядра клетки молочной железы одной овцы в энуклеированную яйцеклетку другой (рис. 18). Метод основан на тотипотентности ядер соматических клеток и содержании в их геноме полной информации о целом организме.

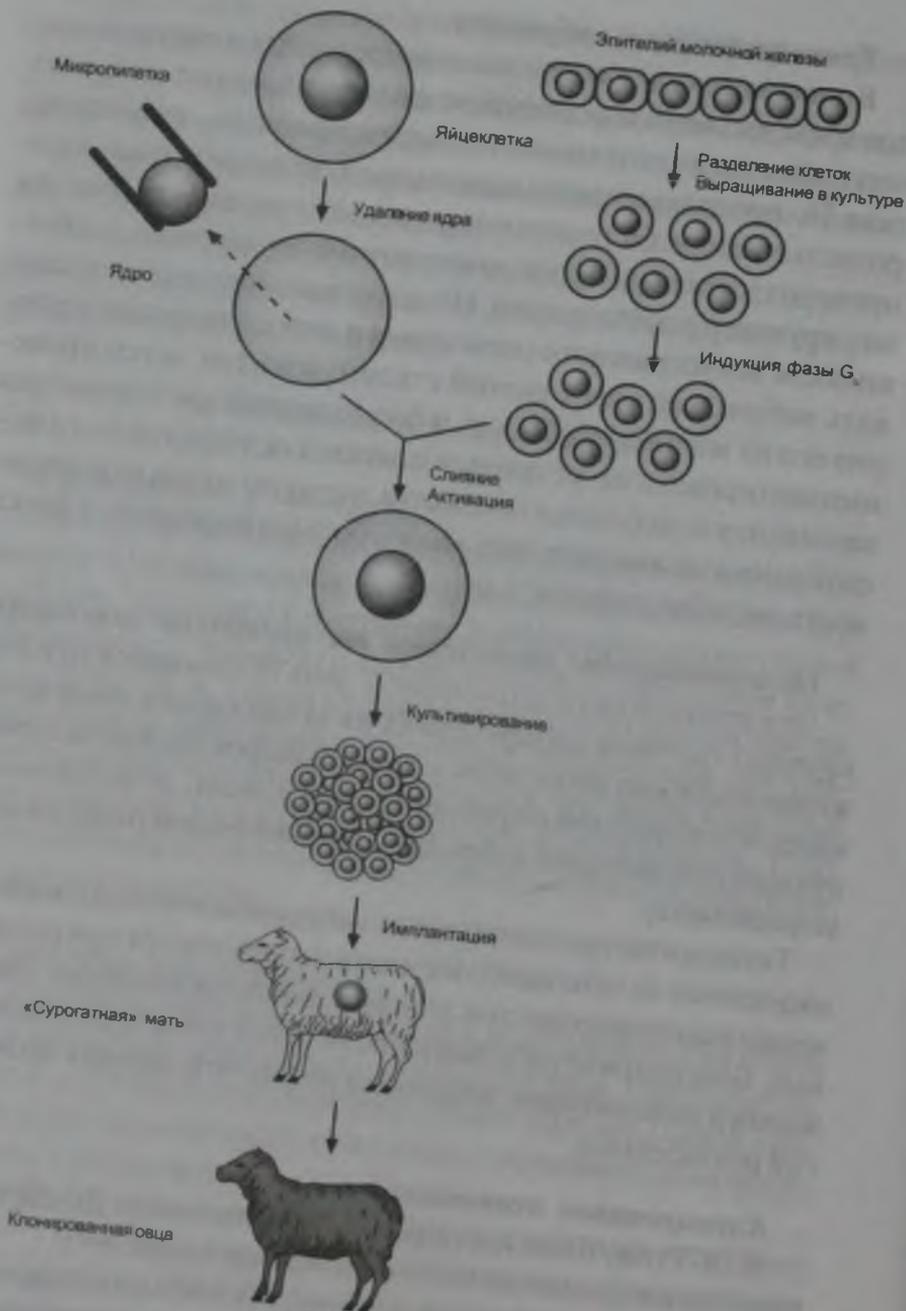


Рис. 18. Клонирование овцы методом переноса ядра
(цит. по Б.Глик, 2002)

Клонировать животное так же можно путем пересадки ядер эмбриональных клеток в энуклеированные яйцеклетки.

Однородных близнецов получают используя микрохирургическую технологию деления эмбриона на ранней стадии развития на две части.

VII. ТЕХНОЛОГИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК

Технологию рекомбинантных ДНК можно охарактеризовать как результат достижений в области генетической инженерии, как технологию объединения *in vitro* различных молекул ДНК, чужеродных генов, с последующей их репликацией в организме реципиента.

В этом отличие технологии рекомбинантных ДНК от традиционной клеточной селекции, основой которой являются мутации и рекомбинации *in vivo*, в живой клетке. Второе принципиальное отличие: технология рекомбинантных ДНК – это технология соединения и клонирования совершенно разного генетического материала (к примеру, объединение генов прокариотных и эукариотных организмов), что практически невозможно при традиционной селекции. Технология рекомбинантных ДНК позволила преодолеть межвидовые, межтканевые барьеры, благодаря успехам в области молекулярной биологии, химии нуклеиновых кислот, генетической энзимологии.

Традиционная селекция вначале достигает определенных результатов по получению новых штаммов-продуцентов, новых линий сортов растений, породы животных, а потом по полученным фенотипическим результатам проводятся исследования по поиску детерминирующего искомым результат гена (генов). А технология рекомбинантных ДНК вначале программирует конкретные генетические изменения, а затем получает искомый продукт, фенотипический результат.

Некоторые исследователи технологию рекомбинантной ДНК называют генной микрохирургией, но хирургией химической, осуществляемой с помощью ферментов рестриктаз и лигаз.

Вместе с тем технология рекомбинантных ДНК – это продолжение традиционной селекции, это анализ результатов практического применения мутаций и рекомбинаций при получении мутантных организмов. Спонтанные и индуцированные мутации, различные методы рекомбинаций (конъюгация, трансформация), создание рекомбинантной молекулы ДНК *in vitro* – все

это эволюционные достижения клеточной и молекулярной генетики, объектом исследования которой является ген.

Технология рекомбинантных ДНК не отвергла достижений традиционной селекции, а, наоборот, основывается на них.

Прежде чем излагать технологию получения модифицированных организмов целесообразно остановиться на механизмах хранения и передачи генетической информации в клетке, при этом отметив разницу между про- и эукариотными организмами.

Геном бактериальной клетки расположен в единственной хромосоме (95-98%) и в плаزمиде (2-5%). Жизненно важная, подавляющая часть генетической информации локализована в хромосоме, представлена суперспирализованной молекулой ДНК. ДНК состоит из двух спиралей, каждая из которых включает определенную последовательность нуклеотидов (аденин, гуанин, тимин и цитозин). Основания эти комплементарны: аденин одной цепи образует пару с тимином другой, а гуанин таким же образом взаимодействует с цитозином. Многомиллионные пары оснований формируют структурные гены (примерно тысяча пар оснований в одном структурном гене), последние кодируют синтез белков. Непосредственно прилежащие к структурным генам последовательности оснований осуществляют контроль экспрессии этих генов в клетке: транскрипции синтеза матричной РНК (мРНК) и трансляции – образования белка с использованием мРНК в качестве матрицы на рибосомах.

Регуляция транскрипции осуществляется промотором и терминатором. Промотор – это короткий фрагмент ДНК, обладающий высоким сродством к ферменту РНК-полимеразе, он способствует перемещению фермента вдоль ДНК-матрицы, инициируя тем самым процесс транскрипции кодирующей цепи ДНК в точке, расположенной перед началом структурного гена. Другой участок ДНК – терминатор, расположен на конце структурного гена и служит сигналом окончания транскрипции. Между промотором и структурным геном находится еще один участок ДНК – оператор, который в присутствии избыточных концентраций клеточного метаболита может связываться со спе-

циальным белком – репрессором и препятствовать процессу транскрипции.

Контроль трансляции белков на рибосоме осуществляют другие последовательности, транскрибируемые в процессе образования матричной РНК. Благодаря тому, что рибосомы присоединяются к специальному участку мРНК, ответственному за связывание с рибосомой, трансляция начинается со стартового сигнала – первого кодона структурного гена; «стоп»-сигнал на конце гена способствует высвобождению полностью синтезированной белковой молекулы.

Изменения внутри кодирующей области, к примеру, могут изменить аминокислотную последовательность фермента и тем самым повлиять на его активность. Незначительное изменение последовательности в промоторе может увеличить вероятность связывания с ним РНК-полимеразы и таким образом повысить скорость транскрипции. Мутации в зоне оператора и в гене-регуляторе могут помешать присоединению репрессора, что снимет запрет с транскрипции и существенно увеличит ее эффективность. Гены, перенесенные в другой организм могут экспрессироваться в том случае, если промотор и участок связывания с рибосомой близки по своей структуре.

Генетический код и основные биохимические реакции процессов транскрипции и трансляции одинаковы в прокариотных и эукариотных клетках. Но в структурных генах эукариот между кодирующими участками (экзонами) расположены некодирующие вставочные последовательности – интроны. Интроны транскрибируются вместе с кодирующими последовательностями – экзонами, но не экспрессируются. Процесс вырезания интронов и объединения экзонов в непрерывную цепь называется сплайсингом; в результате сплайсинга образуется зрелая матричная РНК (мРНК), с которой транслируется белок. Наличие интронов затрудняет экспрессию рекомбинантных ДНК в прокариотных клетках. Поскольку у бактерий нет ферментов, осуществляющих сплайсинг, природный эукариотический ген, содержащий интроны должен быть предварительно освобожден от некодирующих последовательностей для последу-

ющей экспрессии в прокариотной системе. На мРНК с помощью фермента обратной транскриптазы реплицируется комплементарная нить ДНК (кДНК), затем при помощи фермента ДНК полимераза достраивается вторая нить ДНК. Таким образом чужеродный ген экспрессируется в клетке – реципиенте.

Геном прокариотной клетки, вирусов незначителен в сравнении с геномом клеток растений и животных. Поэтому при использовании в генетической инженерии генов вирусов либо бактерий, определенный ген выделить из этих микроорганизмов не сложно, но трудности возникают при поиске и выделение нужного гена из огромного числа генов в клетке человеческого организма. Поэтому проще в эукариотной клетке идентифицировать мРНК, транскрибированную с искомого гена (генов). В клетках животных транскрипция РНК на цепи ДНК осуществляется в клеточном ядре; матричная РНК переносит генетическую информацию из ядра в цитоплазму, где на рибосомах идет трансляция белков. В прокариотных клетках, не имеющих оформленного ядра процессы транскрипции и трансляции идут параллельно, а мРНК изначально связана с рибосомами.

Вышеизложенные некоторые особенности транскрипции и трансляции, механизмы реализации генетической информации лежат в основе технологий рекомбинантной ДНК.

Технология рекомбинантной ДНК следующая: первоначально необходимо из клеток-доноров выделить нативную ДНК (клонированная ДНК, встраиваемая ДНК, ДНК-мишень, чужеродная ДНК), затем при помощи ферментов рестриктаз расщепить ее в определенных сайтах и освобожденный ген (гены) соединить при помощи ферментов-лигаз с переносчиком ДНК - вектором (клонированный вектор) т.е. получить *in vitro* рекомбинантную молекулу ДНК (рис. 21,22).

Сконструированную таким образом рекомбинантную ДНК вводят в клетку – реципиент, где она экспрессируется и кодирует синтез соответствующих белков. По конечному белковому продукту или по идентификации в клетке искомого гена (генов) определяют результат клонирования.

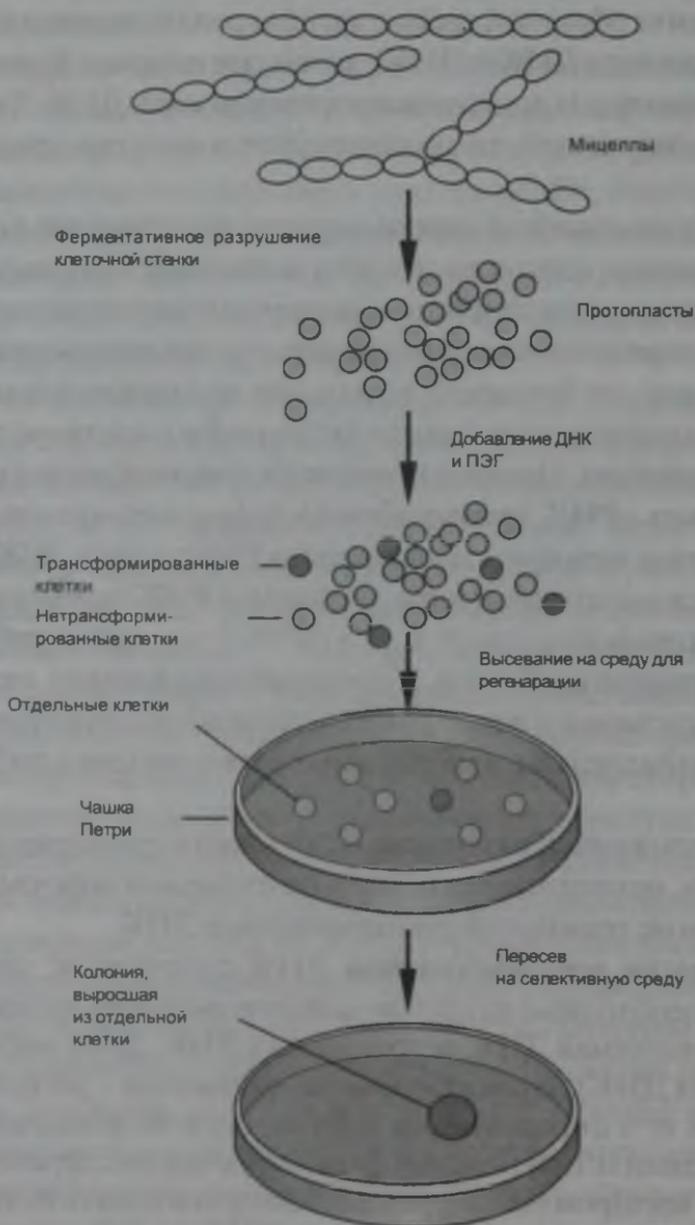


Рис. 21. Схема трансформации и отбора рекомбинантных штаммов *Streptomyces*. Трансформированные клетки обозначены темными кружками, нетрансформированные - светлыми. ПЭГ - полиэтиленгликоль.

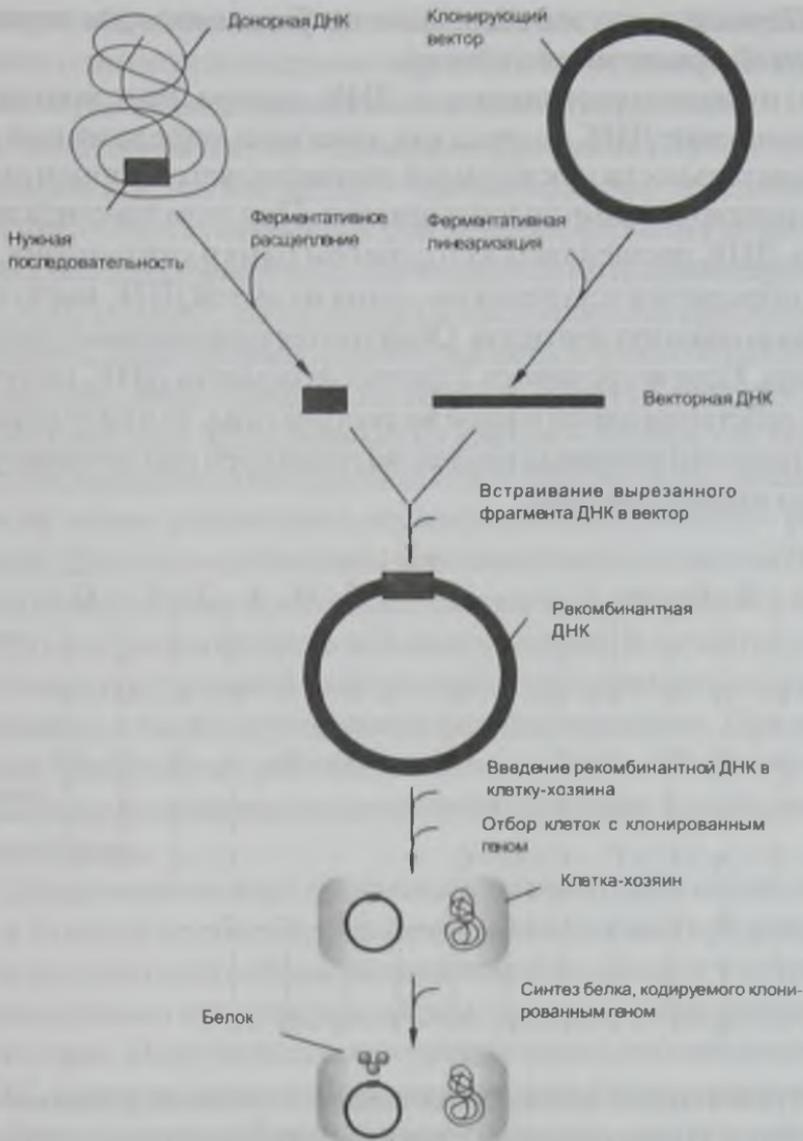


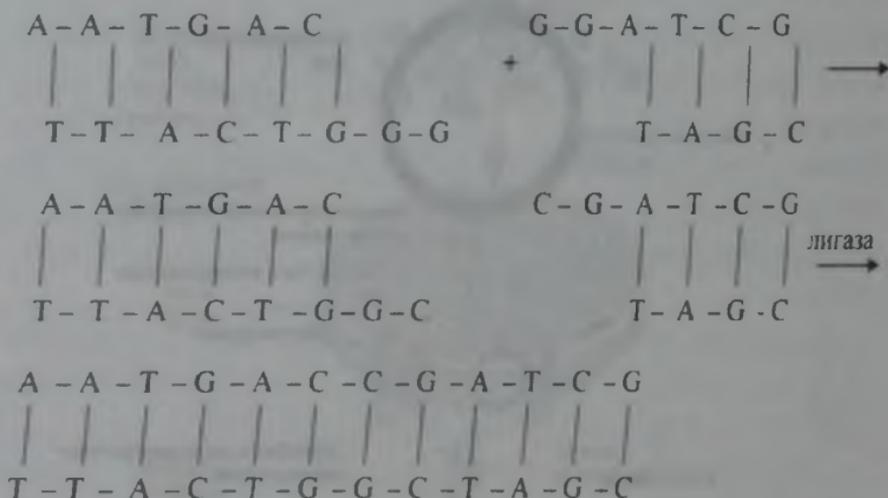
Рис. 22. Клонирование рекомбинантной ДНК.

Донорную ДНК расщепляют рестрицирующей эндонуклеазой и встраивают в клонирующий вектор. Полученную конструкцию вводят в популяцию клеток-хозяев, идентифицируют те клетки, которые содержат рекомбинантную ДНК, и культивируют их.

При необходимости можно индуцировать экспрессию клонированного гена в клетках-хозяевах и получить кодируемый им белок (цит. по Б.Глик, 2002).

Первый этап – это выделение необходимого для переноса в другой организм гена (генов):

а) путем его рестрикции из ДНК-донора. Рестрикция или расщепление ДНК на участках, имеющих определенные последовательности нуклеотидов осуществляется ферментами – рестриктирующими эндонуклеазами. При этом двуспиральная нить ДНК расщепляется со сдвигом рамки считывания, так что образуется «ступенька» – одна из нитей ДНК выступает на несколько нуклеотидов. Образуются однонитевые (липкие) концы. Если встречаются 2 липких фрагмента ДНК, полученных действием одной и иной же рестриктазы, то в силу комплементарности концевых последовательностей они легко вступают во взаимодействие:



Нуклеотидная последовательность с липкими концами может быть: 1) присоединена к вектору, предварительно обработанному той же рестриктазой и 2) превращена из линейной молекулы в кольцевую путем сшивания взаимно комплементарных концов. Но эта процедура не сложна, если речь идет о вирусах, имеющих несколько десятков генов или о бактериях, насчитывающих несколько тысяч генов. А из генома животной клетки, где несколько миллионов генов выделить искомый ген можно:

б) используя метод химического синтеза коротких одноцепочечных фрагментов ДНК (олигонуклеотидов), путем по-

этапного образования эфирных связей между нуклеотидами и сшивки олигонуклеотидов между собой посредством ДНК-лигазы с образованием двухцепочных полинуклеотидов;

в) выделяя из клетки – донора не фрагмент ДНК, а транскрибированную с нее мРНК – это наиболее часто используемый метод. На основе мРНК при помощи фермента обратной транскриптазы (ревертазы) синтезируется нить комплементарной ДНК (кДНК); затем на кДНК достраивается при помощи фермента ДНК-полимеразы вторая нить и таким образом получают ген, необходимый для переноса в другой организм.

Второй этап. Выделенный из клетки – донора ген содержит информацию о конкретном структурном белке, но сам по себе не может реализовать эту информацию в клетке – реципиенте. Для этого необходимы дополнительные молекулы ДНК, способные перенести искомый ген в клетку-реципиент и обеспечить его репликацию в новом организме. В качестве переносчиков генетической информации (векторов) используются плазмиды, а также вирусы животных, бактериофаги. При получении трансгенных растений наиболее типичный вектор – Ti-плазида, выделенная из почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens*.

Соединение вектора с ранее выделенным геном осуществляется *in vitro* в пробирке, кольцевая молекула вектора разрезается рестриктазой с образованием «липких» концов, к которым присоединяют при помощи лигазы «липкие» концы переносимого гена. Полученная конструкция и есть рекомбинантная ДНК, которую далее необходимо ввести в клетку – реципиент.

Наряду со способностью переносить ген – мишень векторы должны иметь генетические маркеры (чаще это устойчивость к конкретному антибиотику, определяемому по результатам посева на селективные питательные среды), содержать достаточное количество сайтов рестрикции (участков, где кольцевая молекула ДНК вектора может быть разрезана специфическими рестриктазами). К сожалению, плазмиды не всегда обладают всеми признаками вектора, поэтому их заранее конструируют по заданным свойствам.

В то же время причиной преимущественного использования в качестве вектора плазмид является их высокая конъюгативность (способность проникать в клетку-реципиент). Они относятся к естественным структурным компонентам бактериальных клеток, расположены в цитоплазме бактериальной клетки в виде кольцевой молекулы ДНК, способной к автономной репликации, благодаря наличию в их составе сайта начала репликации (ori), принимают участие в обмене веществ бактерии, определяют те или иные фенотипические признаки.

Третий этап. Сконструированная рекомбинантная ДНК вводится в клетку-реципиент, стабильно поддерживается, т.е. реплицируется и передается последующим поколениям. Успешность трансформации зависит от компетентности клетки-реципиента, от экспрессирующей активности вектора, родственной близости генетического материала донора и реципиента.

Для успешной трансформации рекомбинантной ДНК в клетку используются протопласты, применяется тепловое воздействие на клетку – реципиент, вводится раствор $CaCl_2$, усиливающий проницаемость клеточной мембраны. В экспериментах прослежено, что из 1000 клеток трансформация случается в 1-2 клетках. В последующем существенно предохранение введенной рекомбинантной ДНК от воздействия рестриктаз клетки – хозяина, которые могут деградировать, расщепить чужеродную ДНК.

После введения рекомбинантной ДНК в клетку начинается его экспрессия (транскрипция и трансляция). Транскрипция внешнего в микробную клетку чужеродного гена возможна лишь при наличии перед этим геном сильного промотора, распознаваемого РНК-полимеразой клетки – хозяина. Последняя детерминирует транскрипцию РНК, которая транслирует синтез на рибосомах чужеродного белка. Опять же синтезируемый белок не должен подвергаться активной деградации клеточными протеазами: необходима ингибция последних в клонированных клетках.

Существуют определенные проблемы, методические трудности в поддержании стабильности клона модифицированного

микроорганизма, связанные с тем что при смене поколений в популяции некоторые клоны теряют плазмиды, содержащие рекомбинантный ген. Клетки, лишившиеся плазмид обычно растут и размножаются быстрее тех, кто сохранил плазмиды. В итоге в популяции начинают доминировать безплазмидные, исходные варианты микроорганизмов.

Среди различных определений сути технологии рекомбинантной ДНК есть и определение ее как химической микрохирургии, осуществляемой ферментами – микроскальпелями, которые подразделяют на несколько групп:

– ферменты, расщепляющие молекулу ДНК в определенных сайтах узнавания на более малые фрагменты. Существует 3 типа рестриктирующих эндонуклеаз (I, II, III). В генетической инженерии в основном применяют рестриктазы II типа, обладающие свойством узнавать и расщеплять ДНК в строго определенных участках нуклеотидной последовательности; расщеплять с образованием «липких» концов, необходимых для последующего соединения с векторной ДНК. Рестриктазы специфичны по сайтам узнавания и расщепления, насчитывается их несколько сотен;

– фермент, синтезирующий комплементарную нить ДНК (к ДНК) на мРНК, так называемая РНК-зависимая ДНК-полимераза или обратная транскриптаза или ревертаза;

– ферменты, участвующие в построении второй нити к ДНК путем удлинения цепи ДНК в направлении $5' \rightarrow 3'$ за счет присоединения комплементарного нуклеотида – это ДНК-полимеразы.

– ферменты, соединяющие фрагменты расщепленной ДНК в кольцевую нить – это лигазы;

– ферменты, катализирующие реакции гидролиза нуклеиновых кислот, деградирующие мРНК после осуществления трансляции либо чужеродные молекулы ДНК – это нуклеазы.

Трансгенные растения и животные

При получении трансгенных растений выполняются следующие этапы:

– поиск и выделение необходимого для трансформации гена (генов);

- выбор соответствующего по генетическим характеристикам растения – реципиента;
- трансформация и экспрессия гена (генов) в составе вектора в клетках растения – реципиента;
- регенерация трансформированных клеток и отбор трансгенных растений.

При получении трансгенных сельскохозяйственных растений чаще всего используются гены, детерминирующие устойчивость к различным неблагоприятным абиотическим (повышенные концентрации солей, пестициды, засуха и др.) и биотическим (фитопатогены, насекомые-вредители) факторам окружающей среды. В качестве доноров генов для трансформации растительных клеток, прежде всего, используются прокариоты, бактериальные клетки. Если для трансформации необходимы гены растений, то предпочтительны их дикие виды.

Для трансформации гена (генов) в качестве вектора часто используются Ti-плазмиды, выделенные из почвенных бактерий *Agrobacterium tumefaciens*. В природных условиях *A. tumefaciens* инфицирует корни растений с образованием опухоли – корончатого гала, нарушающего нормальный рост растений (виноград, косточковые фруктовые деревья, розы). Проникновение *A. tumefaciens* в растительную клетку обусловлено трансформирующей способностью Ti-плазмиды. Ti-плазида интегрирует в геном растения, в результате чего активизируется синтез в клетках фитогормонов (ауксинов и цитокининов), избыток которых и провоцирует развитие опухоли. Одновременно в растениях, инфицированных *A. tumefaciens* начинается синтез углеводородных соединений – опинов, используемых бактериями в качестве источника питания. Этот, существующий в природе путь трансформации растений явился основой использования Ti-плазмид в качестве вектора. Однако предварительно, до применения в трансгенной технологии, из Ti-плазмид удаляются гены фитогормонов и гены метаболизма опинов, но сохраняются гены, ответственные за ее трансформирующую способность.

Наряду с совместным культивированием агробактерий с растительными клетками при трансформации растений приме-

няется метод «бомбардировки» растительных клеток из биобаллистической пушки микрочастицами золота, платины или вольфрама, диаметром 0,2-1,0 мкм, с осажденными на их поверхности молекулами ДНК вектора (рис. 23).

Ti-плазмиды *A. tumefaciens* используются при введении чужеродных генов в геном двудольных и некоторых однодольных растений. С помощью биобаллистической пушки были трансформированы однодольные растения, такие как рис, кукуруза, соя, ячмень, пшеница.

Конструирование рекомбинантной ДНК осуществляется встраиванием искомого гена в нуклеотидную последовательность ДНК Ti-плазмиды с использованием вышеописанных ферментов – рестриктаз и лигаз.

Для трансформации в качестве клеток – реципиентов наиболее удобны культуры изолированных протопластов, полученных из каллусной ткани, либо из мезофилла листа.

Для эффективной экспрессии бактериальных генов в эукариотических клетках необходимо использовать промоторы эукариотных клеток. Такие модификации позволяют эукариотной РНК-полимеразе транскрибировать бактериальную нуклеотидную последовательность и затем мРНК транслировать бактериальные белки в растительных клетках.

Регенерация трансгенных растений зависит от тотипотентности клеток, которая хорошо выражена у двудольных – табак, картофель, свекла, соя, рапс, люцерна, капуста, морковь, томаты; а у однодольных, особенно у злаковых – слабо.

Получение трансгенных животных, чей генотип изменен путем введения чужеродной ДНК наиболее детально изучено на лабораторных мышах и состоит из следующих этапов:

- чужеродный ген (гены) вводят в оплодотворенную яйцеклетку *in vitro*;
- оплодотворенную яйцеклетку инокулируют в организм самки – реципиента;
- из приплода отбирают тех животных, чей генотип претерпел изменения, т.е. трансгеноз имеет место.

Используются следующие методы трансформации чужеродного гена (клонированного гена):

– с помощью ретровирусных векторов, инфицирующих клетки эмбриона на ранних стадиях развития, перед имплантацией эмбриона в самку-реципиента;

– микроинъекцией в увеличенное ядро спермия (мужской пронуклеус) оплодотворенной яйцеклетки;

– введением генетических модифицированных эмбриональных стволовых клеток в предимплантированный эмбрион на ранних стадиях развития.

Более распространен способ микроинъекции ДНК в мужской пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки. Для этой процедуры применяется микроскопическая техника, специальные манипуляторы для введения ДНК, пипетки для микроинъекции имеют внутренний диаметр 0,5-1 мкм. После введения чужеродного ДНК эмбрионы инокулируют животным-реципиентам. Применяемая методика трансгеноза путем микроинъекции ДНК имеет различные схемы.

Так, у лабораторных животных (крысы, мыши) при трансгенозе самкам-донорам вводят гонадотропный гормон для усиления овуляции. При этом число яйцеклеток увеличивается в 5-6 раз. Затем самок спаривают с самцами; оплодотворенные яйцеклетки извлекают из яйцеводов для микроинъекции чужеродной ДНК *in vitro*. Яйцеклетки, содержащие чужеродную ДНК некоторое время культивируют, проверяют на жизнеспособность и микрохирургическим способом вводят в яйцеводы «суррогатной самки-реципиента, у которой вызывают ложную беременность спариванием с кастрированным самцом. У лабораторных мышей ложное спаривание необходимо для успешной имплантации эмбриона в матку. Таким путем получают потомство трансгенных лабораторных животных (рис. 24).

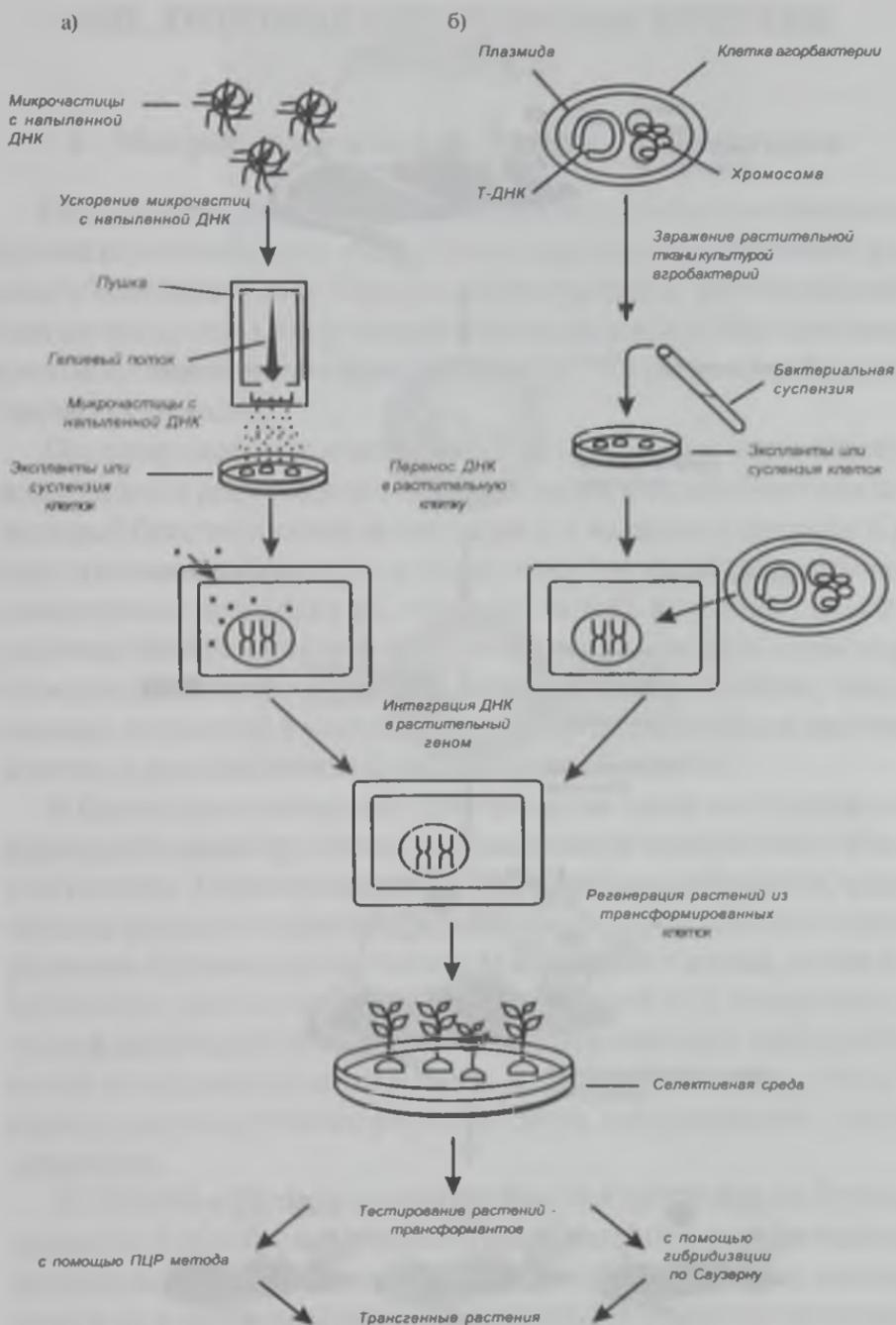


Рис. 23. Схема получения трансгенных растений:
 а) методом биобаллистики; б) кокультивацией с азобактерией.

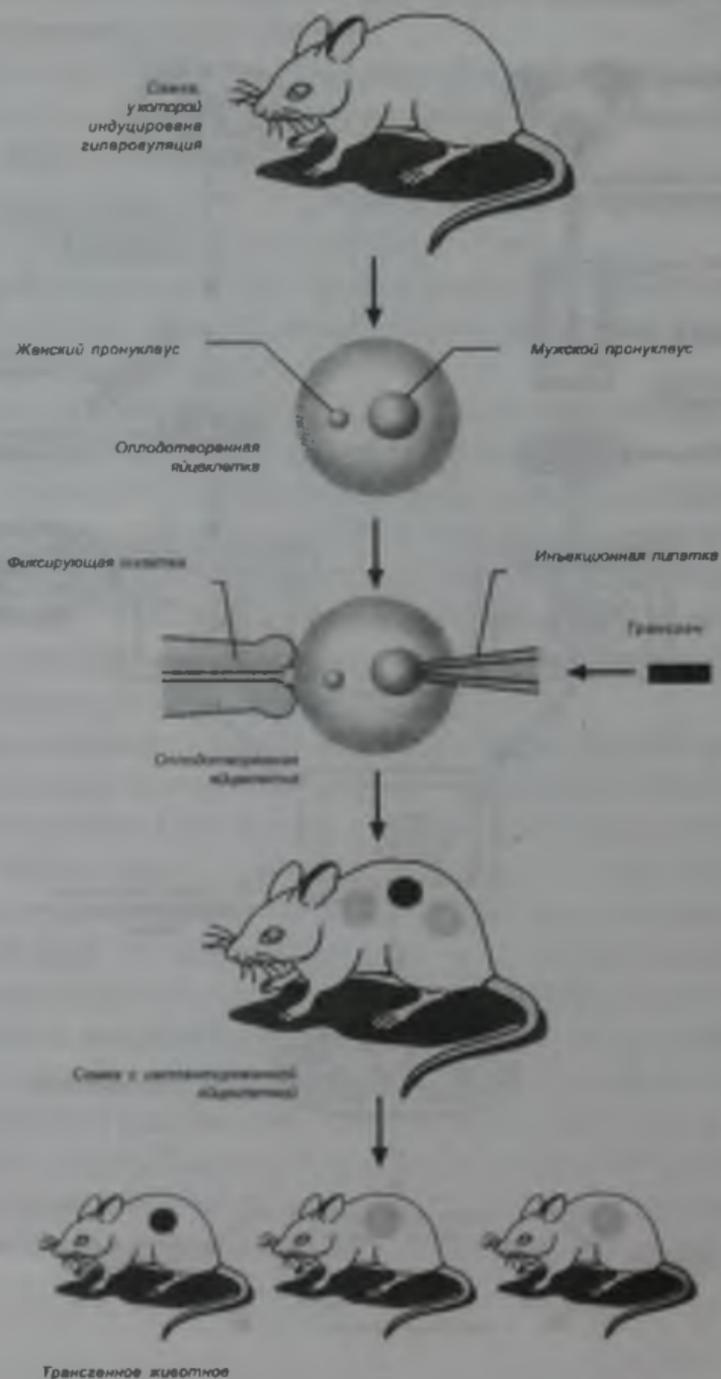


Рис. 24. Получение линий трансгенных мышей методом микроинъекций (цит. по Б. Глик, 2002).

VIII. ТИПОВЫЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

1. Микробиологический синтез, ферментация

Не случайно, процессы протекающие с участием биологических катализаторов – ферментов выделены как типовой процесс в биотехнологии. По-сути, всевозможная биотехнологическая продукция, получаемая с помощью микроорганизмов, клеток и тканей животных и растений – это результат ферментативных реакций.

Поэтому некоторые исследователи ферменты микробного, животного и растительного происхождения выделяют как отдельный биологический агент, наряду с живыми клетками. Существует самостоятельная область научного исследования – инженерная энзимология, основная задача которой – это разработка биотехнологических процессов, в которых используется каталитическое действие ферментов, как правило, выделенных из клеток в чистом виде, либо находящихся внутри клеток, в метаболической системе живой клетки.

В биотехнологическом производстве чаще используются ферментативные процессы, основанные на микробиологическом синтезе. Также применяются ферментные препараты, получаемые из растительного сырья (солод – пророщенное зерно различных злаковых; протеиназы из дынного дерева, из листьев инжира, из сока зеленой массы ананаса и др.), из органов и тканей животных (протеолитические ферменты на мясокомбинатах из поджелудочной железы, слизистой желудка, тонкой кишки, сычуга крупного рогатого скота, гиалуронидаза – из семенников).

В 1970-80-е годы прошлого столетия имело место бурное развитие биотехнологического производства, основанное на ферментации органического сырья (меласса, кукуруза, целлюлоза и др.) при помощи различных групп микроорганизмов. Процесс ферментации осуществлялся в специально разработанных аппаратах – биореакторах (ферментаторах, ферментерах). Объемы промышленных биореакторов достигали нескольких десятков тысяч литров (рис. 25).

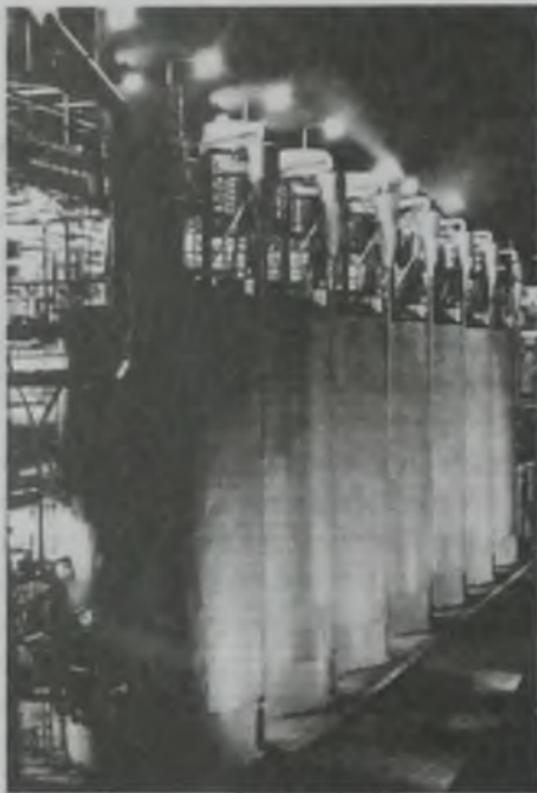


Рис. 25. Находящиеся под открытым небом ферментеры содержат микроорганизмы, превращающие сахар в аминокислоты – глутаминовую кислоту и лизин. Глутаминовая кислота в виде моносодневой соли (МНС) используется в качестве вкусовой добавки. Лизин необходим для питания человека и жвачных животных; его добавляют животным в корм, поскольку сами они синтезировать лизин не могут. Каждый ферментер вмещает 237 825 л и имеет около 30 м в высоту. На фотографии показано семь из 20 одинаковых ферментеров, установленных на заводе «Киова Хакко Когио ко. ЛТД.» в Хофу (Япония). Эти ферментеры построены в начале 70-х гг. и являются крупнейшими на этом заводе, выпускающем аминокислоты. Здесь ежегодно производилось не менее 20 000 т МНС и 10 000 т лизина. Микробиологический синтез аминокислот протекает в аэробных условиях; с помощью трубы, как бы проходящей через воронку, из каждого ферментера удаляется отработанный воздух. Аминокислоты представляют собой группу промышленных химикалиев, которые можно получать с помощью микроорганизмов; две другие группы составляют ферменты и алифатические органические соединения (цит. по Б. Глик, 2002).

Ферментационная аппаратура

Биореакторы представляют собой герметические цилиндрические емкости, высота которых в 2,0-2,5 раза превышает диаметр; изготавливаются они из нержавеющей стали и иных современных материалов. Внутри емкости устанавливаются различного типа мешалки – пропеллерные, турбинные и другие, размеры которых составляют 1/3 внутреннего диаметра аппарата.

Постоянное перемешивание биомассы в ферментере обеспечивает массообмен, равномерный контакт культивируемых клеток с питательной средой, своевременную доставку к клеткам кислорода – быстро расходуемого субстрата, необходимого в постоянной концентрации. Каким бы не был химический состав питательной среды, совершенно необходимо, чтобы все ее компоненты были тщательно перемешаны. Это обеспечивает микроорганизмам доступ ко всем компонентам питательной среды, к субстрату; обеспечивает равномерный и постоянный контакт клеток и растворимых в среде органических веществ, создает определенную стабильность концентрации веществ, pH и температуры во всех точках внутри емкости биореактора.

Для поддержания температурного режима (35-37°C, так как биопродуценты в основном мезофилы) между наружной и внутренней стенками ферментера циркулирует вода с заданной температурой либо устанавливается теплообменник типа змеевика. Водяная рубашка позволяет своевременно и эффективно удалять избыток тепла, выделяемого в процессе жизнедеятельности культивируемых клеток.

Биореактор оборудован специальной системой трубопроводов для подачи питательной среды – субстрата, воды и пара; растворов, регулирующих pH среды, пеногасителей, стерильного воздуха для аэрации культивируемой биомассы. Подключены измерительные приборы для автоматического регулирования процесса ферментации.

Герметичность аппарата, стерильность вводимых веществ (субстрат, воздух, пеногасители, рабочие растворы) – это обязательное условие в технологии ферментационного процесса.

Рабочий объем или объем культивируемой жидкой биомассы не должен превышать 7/10 общего объема емкости аппарата. Свободное пространство над поверхностью жидкой биомассы используется, как буферное, где накапливается пена и таким образом предотвращается потеря культуральной жидкости. Подаваемый воздух очищается от механических частиц, микроорганизмов, химических веществ путем фильтрации (фильтры разные, в том числе гранулированный зернистый или волокнистый материал, $d = 16-18$ мкм).

Технологический цикл контролируется и управляется по следующим показателям:

– физические: температура, давление, частота вращения мешалки, пенообразование, скорость потока воздуха, скорость подачи питательной среды- субстрата, её вязкость и турбулентность;

– химические: рН среды, окислительно-восстановительный потенциал, содержание растворимого кислорода и углекислого газа, концентрация углерода, азота, фосфора, солей и ионов магния, калия, кальция, натрия, железа и др. (рис. 26, 27).

Наиболее часто используется в современном микробиологическом производстве. В сущности реактор представляет собой резервуар, в котором смешиваются субстрат и метаболизирующая его культура микроорганизмов, после чего создаются оптимальные условия для протекания реакций. Температура и рН регулируются. Через среду прокачивают отфильтрованный воздух, иногда насыщенный кислородом. Отбирают образцы для химического и биологического анализа. Чтобы предотвратить загрязнение, используют два способа: 1) все входные отверстия стерилизуются паром, 2) внутри реактора поддерживается давление, превышающее атмосферное. По окончании процесса который может продолжаться от нескольких часов до нескольких дней, всю смесь удаляют из реактора, чтобы можно было выделить и очистить продукт.

Биореактор обеспечивает:

– рост и развитие популяции микроорганизмов в объеме жидкой фазы;

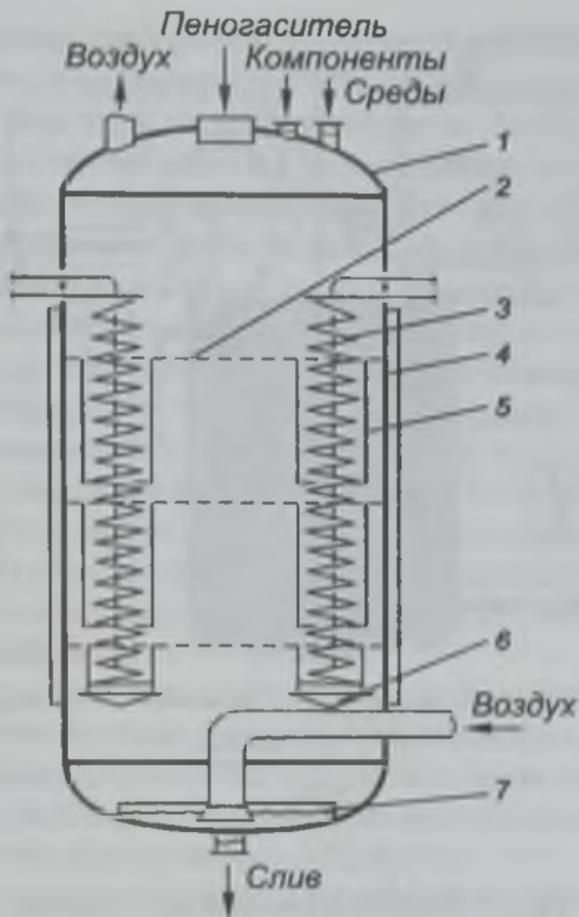


Рис. 26. Схема колонного ферментатора с контактными устройствами:

- 1-корпус, 2-контактное устройство (перфорированная тарелка),
- 3 - змеевик с хладагентом; 4-охлаждающая рубашка;
- 5-труба для нисходящего потока жидкости;
- 6-отбойники; 7-барбот.

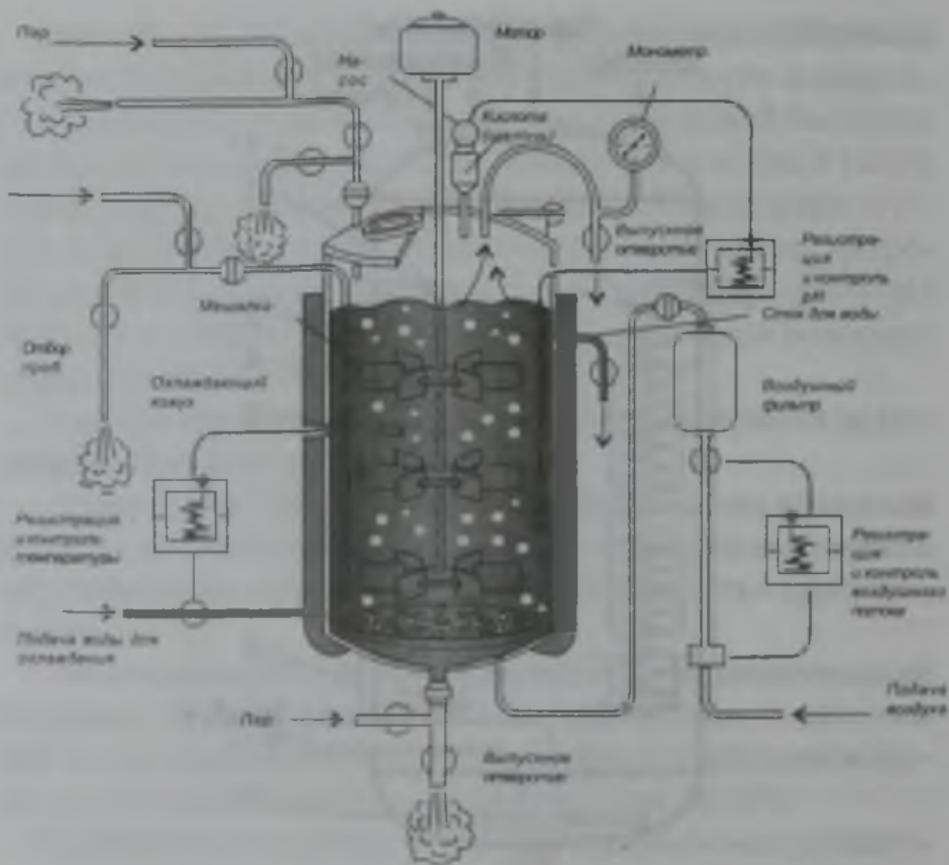


Рис. 27. Реактор периодического действия.

- транспорт питательных веществ к клеткам микроорганизмов;
- отвод от микробных клеток продуктов их обмена;
- отвод от культивируемой биомассы тепловыделений клеток как результата их жизнедеятельности.

В зависимости от микроорганизма – продуцента, утилизируемого субстрата, получаемого конечного продукта условия процесса ферментации и устройство аппарата могут иметь определенные особенности.

Применяются ферментеры периодического и непрерывного действия.

При периодической ферментации аппарат загружается питательной средой – субстратом; вносится посевной материал –

культура штамма – продуцента; проводится ферментация; через определенное время биореактор останавливается, выгружается биомасса вместе с конечным продуктом. Аппарат подвергается чистке, стерилизации и процесс вновь повторяется.

При непрерывной ферментации с момента загрузки аппарата в динамике процесса ферментации постоянно в биореактор подается свежая питательная среда с заданной скоростью и постоянно удаляется адекватное количество биомассы. Ферментационный процесс продолжается в течение нескольких суток.

Биореакторы различаются не только по режиму работы (периодически и непрерывно действующие), но и по размеру и целевому назначению (лабораторные – объемом 3-10 л, опытно-промышленные или пилотные – 30-100 л, промышленные – 100 и более литров), по условиям культивирования (аэробные и анаэробные, мезо- и термофильные, поверхностного и глубинного культивирования и др.).

Для более эффективного использования биокаталитических свойств культивируемые клетки иммобилизуют на носителях, помещаемых внутри биореактора, а питательная среда как бы омывает их; клетки фиксированы и более стабильно, длительно проявляют ферментативную активность.

В целом технология процесса ферментации в биореакторах типична. К примеру, при периодической ферментации соблюдаются следующие типичные этапы:

- стерилизация питательной среды – субстрата, емкости биореактора, вспомогательного оборудования;
- загрузка аппарата питательной средой – субстратом;
- внесение посевного материала – чистой культуры штамма – продуцента;
- процесс ферментации, начинающийся с роста клеток, их последующего размножения и синтеза конечного продукта (в зависимости от того, это первичный или вторичный метаболит синтез конечного продукта может происходить на разных фазах размножения микроорганизмов – в середине, конце);
- отделение и очистка конечного продукта.

Также правомерно подразделение ферментационного процесса на два этапа: биологический этап, связанный с подготов-

кой биологического объекта, его культивированием, ферментацией, очисткой биопродукта; не биологический этап, включающий предварительную обработку сырья, подбор и подготовку питательных сред, стерилизация биореактора и вспомогательного оборудования, регулирование подачи кислорода, рН, температурного режима – это инженерная составляющая процесса ферментации.

Разработка конструкций биореакторов, оптимизация условий культивирования биомассы, обеспечение автоматического контроля за динамикой ферментационного процесса, разработка способов выделения и очистки биопродукта, поддержание оптимальных условий, способствующих биохимической трансформации сырья в конечный продукт, создание условий, позволяющих максимально сохранить биопродукт от инактивации во время ферментационного процесса и выделения его из общей биомассы – вот, пожалуй, суть инженерного, не биологического этапа ферментационного процесса.

Стадия ферментации – центральная стадия, основа всего ферментационного процесса, когда в результате биосинтеза или биотрансформации из субстрата, из сырья получают при помощи биокатализатора (микроорганизмы, клетки животных и растений) целевой продукт (аминокислоты, витамины, антибиотики и др.)

Естественно, ферментационный процесс имеет существенные отличия от химического синтеза:

- чувствительность клеток (особенно животного и растительного происхождения, мицелиальных грибов) в отличие от химических катализаторов к физико-химическим воздействиям, неизбежно возникающим в биореакторе при осуществлении аэрации, перемешивания биомассы;

- сравнительно низкая скорость роста культур клеток в отличие от химических реакций: время удвоения концентрации биомассы составляет от нескольких десятков минут до нескольких суток;

- поддержание стерильности ферментационного процесса в биореакторе, его герметичность, предохраняющая от контаминации посторонней микрофлорой;

- определенная сложность регуляции биохимических механизмов роста культуры, синтеза необходимых метаболитов;
- нестабильность полученного конечного продукта, требующая создания определенных технологий по сохранению его биологической активности.

Вышеизложенные отличия ферментации от химического синтеза связаны с определенными сложностями регуляции биокаталитических процессов в биореакторе, комплексом технологических особенностей, с особенностями метаболизма самого биологического объекта и др.

Подготовительный этап начинается с отбора штамма-продуцента, оценки его продуктивности, т.е. способности быстро и эффективно вести биосинтез целевого метаболита; его устойчивости к фаголизису, изменениям рН и температурного режима, аэрации; способности хорошо расти на недифицитных, недорогостоящих питательных средах. Этот этап всецело посвящен биологическому объекту – «производительной силе».

Затем в лабораторных условиях наращивается чистая культура биопродуцента для последующей передачи на стадию ферментации; это этап подготовки посевного материала.

Одновременно подготавливается питательная среда, включающая подбор компонентов, их концентрации в зависимости от метаболических потребностей культивируемого штамма – продуцента; стерилизации среды с учетом термолабильности некоторых компонентов (углеводы, белки и др.). При необходимости щадящего режима обработки используется кратковременное воздействие горячим влажным паром, применяется холодная стерилизация (микро – и ультрафильтрация). Нарушение стерилизации может привести к загрязнению питательной среды посторонней микрофлорой, может быть инактивация её компонентов и т.д.

В промышленных условиях питательная среда, её основа – это утилизируемый субстрат из которого путем биосинтеза или биотрансформации получают целевой продукт. Субстрат также требует определенной подготовительной работы.

К примеру, к распространенному сырью, используемому при производстве этанола относится меласса, являющаяся отхо-

дом сахарного производства и очень широко применяемая в микробиологическом синтезе из за того, что многие микроорганизмы при продукции белков, биологически активных соединений прекрасно утилизируют углеводы, входящие в её состав. Мелассу предварительно разбавляют водой, подкисляют, добавляют микроэлементы, удаляют избыток двухвалентного железа. Это требует вспомогательного оборудования и технологий. При выборе сырья учитывается не только физиологическая потребность штамма – продуцента, но и его стоимость, возобновляемость и достаточность. Поэтому в биотехнологическом производстве широко используются кукуруза, меласса, орехи, глюкоза, сахароза, уксусная кислота, метанол, пальмовое масло, парафин, дрожжевой автолизат и экстракт, молочная сыворотка, экстракт пшеничных отрубей, экстракт солодовых проростков и др.

Существует технологическая цепочка, когда отходы или побочный продукт одного биотехнологического процесса используются как дешевое сырье для другого. Так, на отходах, остающихся при микробиологическом синтезе этанола выращивают биомассу одноклеточных микроорганизмов – дрожжей используемых в качестве кормовой добавки.

Конечной целью биотехнологического процесса может быть либо накопление биомассы самих микроорганизмов – дрожжей, бактерий, мицелиальных грибов, которые после необходимой очистки используются как готовый продукт (как белок микроорганизмов, кормовой белок). Либо задачей биотехнологического процесса является не только и не столько накопление клеток продуцента, сколько ценных биологически активных веществ – метаболитов, синтезируемых микробными клетками – аминокислот, ферментов, антибиотиков и др. Некоторые биологически активные вещества – лекарственные препараты, витамины получают путем микробиологической трансформации.

Динамика и интенсивность ферментационного процесса непосредственно связаны с биологическим циклом, ростом и размножением штамма – биопродуцента. Поэтому знание и учет состояния биологического объекта, динамики метаболического процесса – решающий фактор всего процесса ферментации.

Посевной материал или чистая культура штамма – продуцента, внесенная в биореактор с питательной средой размножится не сразу. Вначале, в течение нескольких часов микроорганизмы приспосабливаются к новым условиям (питательная среда, субстрат), адаптируются к составу утилизируемого субстрата. В это время имеет место рост клеток, увеличение концентрации ферментов, нуклеиновых кислот, особенно РНК – это lag фаза.

Затем наступает фаза экспоненциального развития, отмечается быстрое деление клеток, размножение микроорганизмов, накопление их биомассы.

В последующее время постепенное уменьшение ингредиентов питательной среды, увеличение концентрации клеточных метаболитов, ингибирующих активность ферментных систем по типу обратной связи приводит к снижению темпа роста и размножения клеток. Это фаза замедленного роста.

Стационарная фаза характеризуется некоторой стабильностью количества микроорганизмов в культивируемой среде вследствие равного соотношения вновь появляющихся и отмирающих клеток.

И, наконец, фаза отмирания, т.е. постепенное уменьшение концентрации жизнеспособных, растущих клеток.

Длительность протекания выше изложенных фаз роста и размножения зависит от физиологических особенностей биопродуцента.

К примеру, она равна у *Bacillus thuringiensis* 36 часам, а у *Aspergillus awamori* 144 часам и т.д. Далее оптимальная рН для грибов – 4,0-6,0, а для большинства бактериальных культур – 6,0-7,4. Оптимальные кинетические характеристики биопродуцента зависят также от условий культивирования, различных физико – химических факторов (табл. 20).

Завершающий этап ферментационного процесса – это выделение конечного продукта из общей биомассы, из культуральной жидкости. На этапе очистки часть конечного продукта теряется (табл. 21).

Технология очистки биопродуцента включает различные методические подходы, несколько последовательных стадий.

Основные факторы среды, определяющие рост и биосинтетическую активность продуцентов

Фактор	Роль при культивировании	Методы управления фактором
1	2	3
Состав и концентрация питательных веществ	Обеспечивают метаболизм	Составление оптимальной композиции; подпитка во время ферментации; непрерывность процесса; многостадийность с учетом потребностей продуцента по фазам развития и т.д.
Концентрация продукта и ингибиторов	Замедляет биохимические реакции	Осаждение продукта по мере накопления; ферментация с диализом; ферментация под разрежением с испарением летучего продукта и др.
pH	Оптимизирует скорость биохимических реакций (пределы от 3,5 до 9,0)	Регулирование путем добавления кислоты и щелочи
Температура	Оптимизирует скорость биохимических реакций (обычно равна 20-70 С)	Охлаждение или подогрев культуральной жидкости при помощи теплообменников или температуры подаваемых в биореактор субстратов
Осмотическое давление или активность воды	Определяет границы жизни (составляет 0,6-0,998)	Составление сред с оптимальной концентрацией питательных веществ или влажностью твердой среды; поддержание на постоянном уровне во время ферментации путем разбавления водой или добавления отдельных компонентов
Содержание растворенного кислорода	Для аэробов обеспечивает аэробный метаболизм; является акцептором H^+ ; ингибирует развитие анаэробов	Для аэробных процессов регулируют интенсивность аэрации или добавлением к газовой смеси кислорода; при атмосферном давлении и 20°C в 1 л среды растворяется 0,28 мМ O_2 . Анаэробные процессы реализуют в бескислородной среде, что достигается продуванием N_2 и CO_2 или добавками восстановителей (цистеина, аскорбиновой кислоты и др.)

1	2	3
Содержание диоксида углерода	Источник углерода для автотрофов, гетеротрофы - некоторые нуждаются, а некоторые замедляют метаболизм в присутствии CO ₂	Продувание в фотосинтезирующих процессах ферментации газовой средой, обогащенной CO ₂ , выделению CO ₂ из жидкой фазы способствует перемешивание
Перемешивание среды	Равномерное распределение питательных веществ и биомассы по всему пространству среды	Организируют макро- и микроперемешивание в биореакторах при помощи механических мешалок, барботажных, циркуляционных и других систем. Аэрация способствует осаждению биомассы
Вязкость среды	Определяет диффузию питательных веществ и перемешивание клеток продуцента	Регулирование компонентами питания, характером и концентрацией биомассы, а также наличием некоторых полимерных экстрацеллюлярных продуктов. Вязкость влияет на перемешивание и аэрацию, для чего требуются специальные технические средства

Таблица 21

Потери выходов в тицильных ферментационных процессах (по Crueger, Crueger, 1984).

<i>Продукт ферментации</i>	<i>Потери выхода, %</i>
Белок одноклеточных	5
Антибиотики	20-50
Внеклеточные ферменты	10
Внутриклеточные ферменты	90

Это обусловлено недостаточной стабильностью полученного продукта; влиянием на его качество даже незначительных колебаний рН, температуры; малыми концентрациями конечного продукта в среде культивирования; внутриклеточным расположением искомого метаболита и др.

Вместе с тем технологические приемы, используемые для отделения клеток от культуральной среды в сильной степени зависят от природы продуцента и определяются целью биотехнологического производства. Так, при получении белка одноклеточных микроорганизмов в качестве кормовой добавки интерес представляют лишь сами клетки, поэтому на стадии выделения ставится задача возможно более полного отделения клеток от жидкой фазы путем сепарации. Сепарацию осуществляют фильтрацией через пористый материал или седиментацией в больших центрифугах. Отделенную от жидкости клеточную биомассу подвергают мягкой тепловой обработке – выпариванию, затем подсушивают, придают товарную форму, фасуют.

Но если целевой продукт не является клеточной биомассой, а есть первичный или вторичный клеточный метаболит, то степень очистки совершенно иная, более глубокая.

При извлечении внутриклеточных метаболитов клетки разрушаются, дезинтегрируются. Дезинтеграция может быть физико – механической (механический дезинтегратор, ультразвуковой дезинтегратор), либо применяются литические ферменты (ферментная дезинтеграция). При получении микробных метаболитов концентрация целевых продуктов в культуральной среде, в среде дезинтегрированных клеток в большинстве случаев очень низкая (менее 1%). При выделении и концентрировании конечного продукта – метаболита применяются следующие технологии:

– вакуум – выпаривание: невысокая температура испарения, кратковременность контакта целевого продукта с теплоносителем, непрерывность процесса позволяют выделять даже термолабильные биологически активные вещества;

– вымораживание (концентрирование и обессоливание конечного продукта): многоступенчатый либо одноступенчатый процесс; путем распыления фильтрата культуральной жидкости на холодную поверхность;

– сорбционная очистка: в белках имеются функциональные группы, сообщающие ей при соответствующих значениях рН среды кислые или щелочные свойства. Поэтому белки способны сорбироваться по ионообменному механизму. Для сорбции белков чаще используют иониты на основе целлюлозы: катионит – карбоксиметилцеллюлоза и анионит-диэтиламиноэтилцеллюлоза;

– экстракция: липофильные вещества концентрируются в фильтрате при помощи органических растворителей – пропанол, бутилацетат и др.;

– ультрафильтрация: нет денатурации белка, нет температурного воздействия, процесс непрерывный; в отличие от других способов концентрирования данная технология позволяет одновременно удалять из растворов все низкомолекулярные балластные примеси, т.е. она одновременно выполняет функции и концентрирования и очистки; используются полупроницаемые мембраны;

– осаждение белков: при помощи повышенных концентраций солей из водных растворов (чаще применяется сульфат аммония, хорошо растворимый и относительно дешевый); применяются органические растворители. Действие органических растворителей основано на снижении диэлектрической постоянной среды, значение которой определяет силы электрического притяжения и отталкивания. Устойчивость белковых растворов обусловлена наличием гидратного слоя у белковой молекулы; если разрушить гидратную оболочку, то начинается конгломерация и осаждение белков. Для этого молекулы добавляемого вещества должны быть более гидрофильными, чем молекулы белка. В качестве осадителей используют этанол, метанол, ацетон, изопропанол и др.

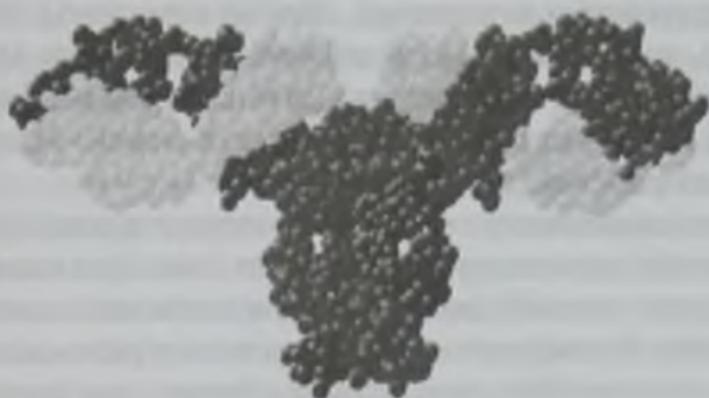
2. Технология моноклональных антител

Антитела или иммуноглобулины являются высокоспецифическими белками, продуцируются В-лимфоцитами (плазмócитами) в ответ на внедрение в организм чужеродных антигенов и способны взаимодействовать только с данными антигенами. В качестве антигенов могут быть возбудители инфекций (бактерии, грибы, простейшие, вирусы), биоорганические вещества не инфекционного характера (чужеродная сыворотка, пыльца растений, различные ксенобiotики, яды, ферменты, гормоны, клетки трансплантата).

При попадании в организм чужеродного антигена, распознаваемого иммунокомпетентными клетками, из В-лимфоцитов, находящихся в крови, селезенке, лимфоузлах и являющихся клетками – предшественниками антителопродуцентов, дифференцируются плазматические клетки – истинные продуценты антител и иммуноглобулинов (рис. 28).

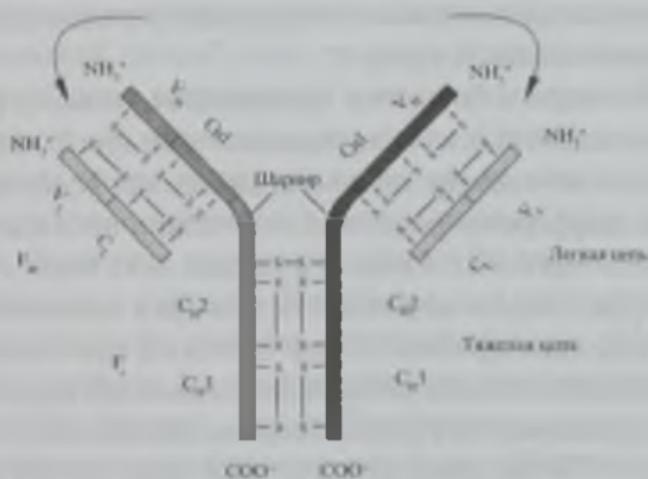
Классическая технология получения антител или иммунных сывороток заключается в многократном введении лабораторным животным чужеродных антигенов – метод гипериммунизации. В сыворотке крови иммунизированного животного на 10-14 сутки накапливаются антитела в высоком титре. У иммунизированного животного проводится забор сыворотки, ее очистка от балластных веществ либо выделяется гамма-глобулиновая фракция; соответственно получается иммунная сыворотка либо иммунные гамма-глобулины (иммуноглобулины).

Антитела полученные методом гипериммунизации являются поликлональными. Суть в том, что любая чужеродная клетка (микробная, животного либо растительного происхождения) либо вирусная частица содержит десятки антигенных детерминант различной специфичности. А в организме насчитывается 10^7 - 10^8 клонов различных В-лимфоцитов, каждый из которых продуцирует антитела одной специфичности, комплементарные к конкретному антигену. Поэтому на вводимый комплекс антигенов синтезируется соответствующее число разной специфичности антител разными клонами В-лимфоцитов, т.е. получается поликлональная, поливалентная сыворотка.



а

Антигенсвязывающие центры



б

Рис. 28. Строение молекулы иммуноглобулина (а) и ее схематическое изображение (б).

Существует метод, предложенный Каstellани по получению из поливалентной сыворотки моновалентной путем обработки ее известными антигенами. К примеру, если при гипериммунизации в качестве антигена вводили инактивированную культуру микроорганизмов, содержащих О, К, Н-антигены, то внося в сыворотку только О и К антигены (они реагируют с

соответствующими антителами, образуя комплексы антиген-антитело, легко удаляемые из сыворотки) получают моновалентную сыворотку. Она содержит антитела только к Н-антигену. Но о степени однородности антител, о моноклональности такой сыворотки сказать трудно.

О моноклональности антител можно говорить если изначально в качестве антителопродуцента будет взят один клон, одна родительская клетка В-лимфоцита. Для этого необходимо выделить клон В-лимфоцита, культивировать и размножить его *in vitro*, стимулировать антигеном и выделить синтезируемые им антитела. К сожалению, В-лимфоцит, как и любая дифференцированная клетка *in vitro* сохраняется в течении 5-10 пассажей, затем погибает, теряет специфичность. Как сохранить функциональную активность и долгожительство (длительный рост и размножение *in vitro*).

С 1950 годов в биологии применяется технология культивирования животных клеток, тканевых культур *in vitro*, используя сходные по составу питательные среды. Культивировали не только дифференцированные, но и атипичные клетки, в том числе плазмоцитомы, продуцирующие антитела.

Культуры клеток животных и человека используются для решения научных проблем общей биологии, цитологии, генетики, вирусологии, иммунологии и инфекционной патологии. Одним из направлений научных исследований явилось слияние разных клеток. Путем слияния клеточных фрагментов (ядра, цитоплазмы, хромосом), окруженных плазматической мембраной, можно создать новую, до того в природе не существовавшую гибридную клетку.

Ключевой позицией в технологии моноклональных антител является получение гибридом. Предистория их получения следующая. Милстайн, молекулярный биолог занимался экспериментами по слиянию крысиных и мышьиных миеломных клеток, его сотрудник Келер изучал процесс мутаций генов, кодирующих синтез иммуноглобулинов, вариабельность антител при иммунном ответе. Келер полагал, что для изучения мутационных изменений идеальным объектом был бы изолированный

клон, отдельно взятый клон, синтезирующий антитела одной специфичности. Ограбав технику слияния миеломных клеток Келер занялся получением клона клеток, секретирующих антитела к известному антигену. Он предполагал слить миеломную клетку с клоном В-лимфоцитов, взятым из популяции, предварительно имевшей контакт с определенным антигеном. Полученная путем такого слияния клетка должна была бы синтезировать антитела одной специфичности и одновременно обладать способностью к неограниченному росту подобно злокачественной миеломной клетке. В конце 1974 года Келер получил химерную клетку слиянием миеломных клеток и лимфоцитов из селезенки мыши, иммунизированной эритроцитами барана. Клетки – химеры, полученные слиянием антителообразующих и опухолевых клеток были названы гибридомами.

Классический способ (или традиционная биотехнология) получения антител заключается в гипериммунизации лабораторных животных заданным антигеном. Однако полученные классическим путем сыворотки, исходя из вышесказанного обладают рядом существенных недостатков. К ним относятся, во-первых, наличие в сыворотке антител не только к заданному антигену, но и к другим. Во-вторых, для получения чистых антител необходима очистки антигена, что для дефицитных антигенов (гормонов, ферментов и др.) технически сложно. Кроме того, любой антиген – это не биополимер в целом: антигенной специфичностью обладают лишь определенные участки, так называемые детерминантные группы. Их выделение в необходимом для иммунизации животного количестве связано с большими технологическими трудностями. А при введении гетерогенной смеси образуются антитела разной специфичности; сопутствующие примеси могут быть по иммуногенности сильнее, чем искомый антиген.

Технология получения моноклональных антител, гибридомная технология.

На рисунках 29, 30 показаны этапы получения моноклональных антител, гибридомной технологии.

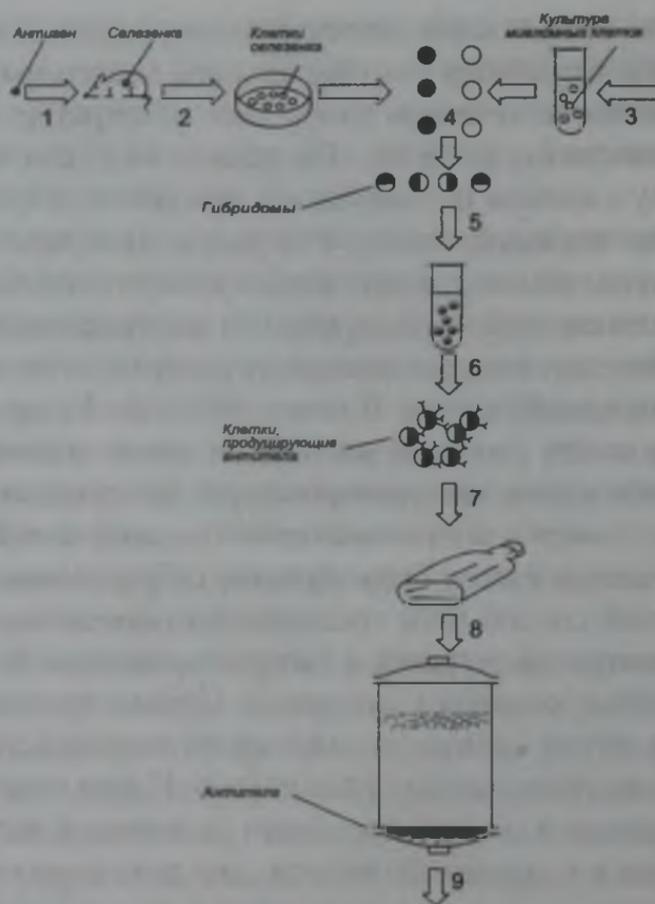


Рис. 29. Этапы получения моноклональных антител
(цит. по У.Э. Виестур, 1990)

1-иммунизация животного; 2-выделение клеток селезенки; 3-подготовка миеломных клеток; 4-слияние миеломных и селезеночных клеток; 5-выращивание гибридных клонов; 6-отбор позитивных гибридом; 7-получение массовых культур гибридомных клеток; 8-концентрирование и очистка моноклональных антител; 9-анализ антител и определение их специфичности.

– **Иммунизация.** В начале одним из известных способов выделяются и очищаются антигены-вещества белковой, белковолипидной, белковополисахаридной, липополисахаридной и иной природы. Затем очищенным антигеном иммунизируется лабораторное животное (чаще это лабораторные мыши линии

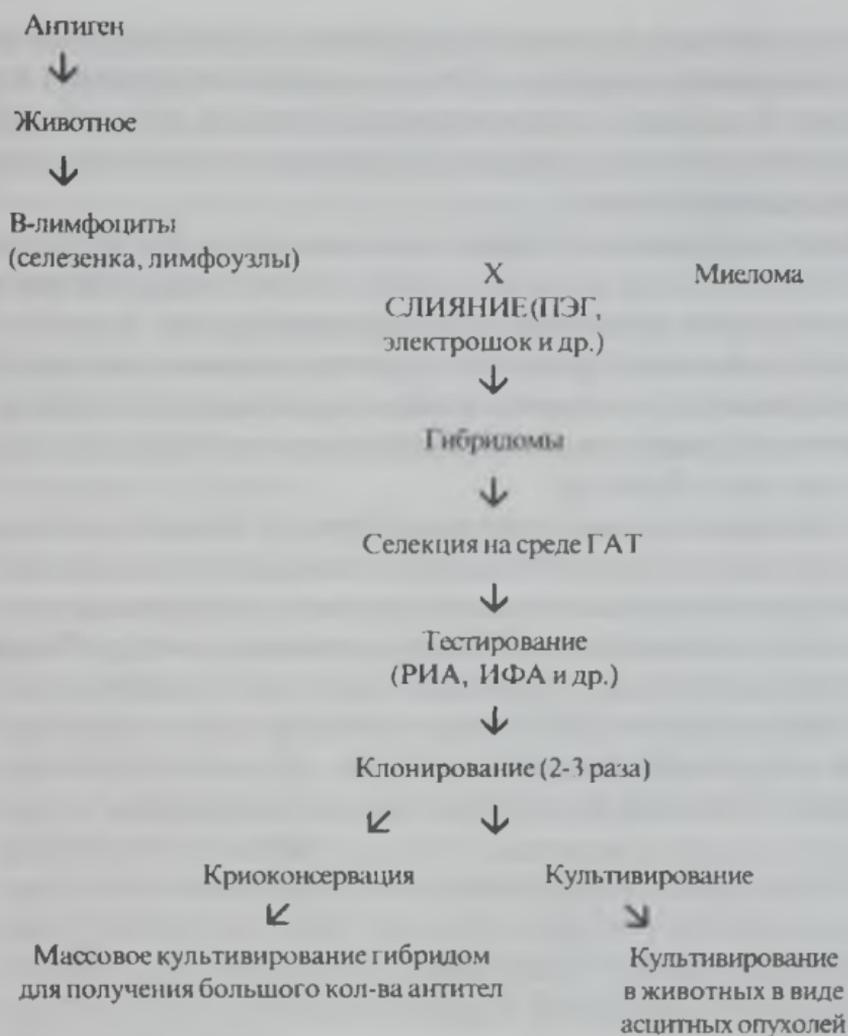


Рис. 30. Общая схема получения гибридом
(по К.И. Галактинову, И.В. Фриндлянской, 1986)

BALB/c). Схема иммунизации зависит от природы антигена, его иммуногенности. Возможна иммунизация антигеном *in vitro* культивируемых В-лимфоцитов. Но при использовании технологии иммунизации *in vitro* В-лимфоциты синтезируют в основном IgM, тогда как при иммунизации *in vivo* в сыворотке крови, селезенке преобладают иммунные IgJ, обладающие большей специфичностью. Если все же проводится иммунизация *in*

in vitro, то для этого спленоциты в условиях питательной среды обрабатывают антигеном. При этом сокращается время иммунизации до 5 дней, а также возможен контроль хода событий путем определения активности лимфокинов и монокинов в пробах реакционной смеси.

Антиген вводится лабораторным животным повторно для достижения более выраженного иммунного ответа, получения более высокого титра антител в сыворотке крови, селезенке, лимфоидной ткани. При необходимости усиления антителообразования антиген вводится совместно с адьювантом-неспецифическим стимулятором иммунного ответа. Чаще используется адьювант Фрейнда.

– *Выделение клеток селезенки.* Через 10-14 дней с начала иммунизации или через 3-4 дня после последнего введения лабораторным животным антигена выделяют селезеночные клетки, в том числе В-лимфоциты. Селезенку помещают в чашку Петри с питательной средой, содержащей сыворотку и перфузируют. Полученную клеточную суспензию центрифугируют, предварительно эритроцитарные клетки лизируют, отделяют лимфоцитарную массу. Затем лимфоцитарные клетки суспендируют в питательной среде без сыворотки и проверяют на жизнеспособность.

– *Подготовка миеломных клеток.* Клетки миеломы человека и мышей интенсивно изучались уже с конца 60-х годов, так как представляют собой уникальную модель клона антителопродуцирующих клеток. Однако эта система оказалась применимой для синтеза антител к заданному антигену, которым производилась иммунизация. Чаще применяются миеломные клетки мышей линии BALB/c. Наиболее популярным являются перевиваемые миеломы MOPC-21 (minezal oil induced plasmocytoma 21), которая была получена после интраперитонеального введения минерального масла самкам мышей BALB/c. Проводится отбор нескольких линий миеломных клеток с хорошей способностью образовывать гибридные клетки.

– *Слияние миеломных и селезеночных клеток.* Для слияния (гибридизации) коротко живущих лимфоцитов гипериммунизированных мышей, продуцирующих антитела, с постоянно растущими клетками плазмоцитомы (миелома мышей) *in vitro*

необходимо создать оптимальные условия для сохранения их функциональной активности. Это динамическая система взаимодействующих составляющих элементов (клеток), которые находятся в постоянном размножении, развитии, отмирании. Поэтому создание наиболее адекватных условий жизнедеятельности клеток вне организма – одна из основных проблем клеточной биотехнологии.

Клетки для слияния берут в логарифмической фазе роста. До момента слияния клетки должны находиться в этой фазе по крайней мере одну неделю. Миеломные клетки можно брать для слияния в экспоненциальной фазе, т.е. через 24 часа после очередного пересева.

Однако частота спонтанных слияний мембран клеток *in vitro* невелика, поэтому для ее увеличения необходимо индуцировать слияние мембран с помощью биологических, химических или физических слияющих агентов. В 70-е годы для слияния симпластов использовали вирус Сендай, с 80-х годов наиболее часто применяется полиэтиленгликоль (ПЭГ) с молекулярной массой 1500–4000 Да. ПЭГ – это водорастворимый полимер, универсальный и чрезвычайно удобный индуктор слияния, размягчающий клеточную стенку.

Использование биологических агентов-вирусных частиц для усиления процесса слияния клеток обусловлено тем, что при адсорбции и проникновении вирусов облегчается, активируется слияние клеточных мембран, образование многоядерных клеток-симпластов.

В качестве физических методов индукции слияния применяется воздействие электрического поля. При кратко-временном воздействии электрическим импульсом на близко расположенные клеточные мембраны происходит снижение толщины плазматических мембран и нарушение их целостности с образованием трансмембранных пор. Эти изменения приводят к перемещению мембранных структур, и в результате к их слиянию. Одновременное центрифугирование дает более плотный контакт клеток, а это необходимое условие для успешного слияния. Концентрация миеломных и селезеночных клеток не должна превышать 10^6 – 10^7 микробных клеток в 1 мл, иначе ускоряется массовая гибель культивируемых клеток.

Одна из методик слияния лимфоцитов с миеломными клетками мышей, предложенная Р.Г. Кеннет (1983) заключается в следующем: взвесь лимфоцитов и миеломных клеток (9:1-5:1) центрифугируется в течение 10 минут при 1000 оборотах/мин при комнатной температуре. Затем вносится 1 мл 50% ПЭГ – 400, инкубация 1,5-2 мин, центрифугирование 2-3 мин при 1000 оборотах/мин; удаляется ПЭГ; клетки ресуспендируются в питательной среде ГАТ до конечной концентрации $1 \cdot 10^6$ кл/мл. В последующем клоны инкубируются в CO_2 – инкубаторе при $37^\circ C$, 5% CO_2 в селективной питательной среде; через 3 недели среду ГАТ заменяют на ГТ, а через месяц на обычную среду культивирования. К сожалению, слияние В-лимфоцитов человека, а не мышей с миеломными клетками мышей проблемно и не результативно.

- *Выращивание и отбор гибридных клонов.* Гибридные клетки образуются в результате слияния двух целых клеток в одну с общей цитоплазмой и одним ядром. В слиянии могут участвовать самые различные клетки: эмбриональные и взрослого организма, нормальные и злокачественные, активно размножающиеся и неспособные делиться. Гибриды соматических клеток используются для исследования функции генов и их регуляции, механизмов клеточной дифференциации, картирования хромосом, проблем злокачественности, а также для изучения взаимодействия вирусов и клеток хозяина. Гибридные клетки стали основой для одной из важнейших биологических технологий – получения моноклональных антител с помощью гибридной технологии.

В 1970 году появились первые сообщения о получении мышиных гибридом путем слияния миеломных клеток, вырабатывающих различные типы нормальных и измененных молекул иммуноглобулинов. Большинство гибридов продолжало продуцировать все полипептидные цепи иммуноглобулинов, которые синтезировались каждой из родительских клеток. Это привело к заключению, что в гибридных клетках гены иммуноглобулинов экспрессируются кодоминантно. Многие секретируемые гибридомами иммуноглобулины представляют собой смешанные молекулы, состоящие из тяжелых и (или) легких цепей,

синтезируемые обеими родительскими клетками. Кроме того, если гибрид получен путем слияния одной непродуцирующей линии с продуцирующей иммуноглобулины линией, синтез антител продолжается, не подавляется. При этом гибрид продуцирует антитела лишь продуцирующего родителя.

Все вышесказанное привело к мысли создать гибрид культивируемой клетки миеломы и нормальной клетки селезенки иммунизированной мыши.

При выращивании гибридных клонов следует учесть следующие обстоятельства. Неслитые клетки селезенки не продолжают расти, так как они не обладают способностью длительно культивироваться. Однако клетки миеломы обладают выраженной потенцией роста *in vitro* и даже могут вытеснить гибридные клетки. Чтобы этого не случилось, необходимо создать условия, препятствующие размножению родительских миеломных клеток. Для этого используются селективные питательные среды.

Получение массовых культур гибридом возможно также путем – *внутрибрюшинного размножения в асцитной жидкости лабораторного животного.*

Для получения асцита мышам предварительно внутриперитонеально вводят 0,2 мл пристана, через 10-14 дней вводят гибридомные клетки (10^7 кл/мл). Вводимые гибридомные клетки и организм реципиента должны быть идентичны по антигенной гистосовместимости; если гибридомы гетерогенны, то реципиент должен быть иммунологически ареактивен (достигается путем гормональной или лучевой иммунодепрессии).

Слияние, получение клонов гибридных клеток проводится в селективной среде, т.н. системе ГАТ (гипоксантин, тимидин и аминоптерин), где аминоптерин является антагонистом фолиевой кислоты, необходимой для родительских клеток. В ГАТ среде родительские миеломные клетки погибают, а нормальные клетки селезенки не растут. Если селективность среды обусловлена присутствием ГАТ, то высокое питательное качество обеспечивают компоненты основы сред Игла или 199, а также вносимая сыворотка плазмы коров (СПК). СПК способствует хорошему росту и размножению клонов гибридных клеток.

Для обеспечения активного роста и размножения клеток и их слияния в селективную питательную среду одновременно с лимфоцитами и миеломными клетками вносят т.н. клетки питающего слоя – перитонеальные макрофаги, реже мышечные тимоциты, фибробласты и др.

Когда после слияния клеток двух различных линий образуется клон, антитела, которые он продуцирует, необязательно будут моноклональными в иммунном смысле, ибо в каждой клетке гибридного клона присутствуют хромосомы обоих родительских клеток и экспрессия этих хромосом ведет к продукции как селезеночных, так и миеломных иммуноглобулинов. Однако на ранних стадиях размножения гибридные клетки быстро утрачивают часть хромосом, в том числе антителопродуцирующие.

Около 10-15% гибридом продуцируют иммуноглобулины (антитела) исключительно селезеночного происхождения, т.е. специфичные к иммунизирующему антигену; у них отсутствует экспрессия миеломных тяжелых или легких цепей Ig. Гибридомы – продуценты моноклональных антител от клеток селезенки унаследовали способность к синтезу и продукции антител, а от миеломных – способность к неограниченному росту и опухоленности.

Для выделения стабильных клонов гибридных клеток осуществляется 2-3 – кратное клонирование путем лимитирующих разведений в полужидком агаре либо используя прибор – проточный цитофлуориметр.

При сохранении гибридомные клетки помещают в среду культивирования, 20% СПК и 10% ДСФ (диметилсульфоксид); фильтруют, замораживают в жидком азоте. В последующем гибридомы ресуспендируют в этой же среде и используют в работе.

Массовые культуры гибридом можно получить также путем размножения *in vitro*, в культуре тканей либо выращивания суспензионной культуры в ферментере.

– выделение и очистка моноклональных антител

Моноклональные антитела выделяют из культуральной жидкости (если гибридомы размножали *in vitro*) или из асцитной

жидкости (если гибридомы наращивали в брюшной полости лабораторного животного).

При массовой наработке моноклональных антител *in vitro* гибридные клетки поддерживаются в логарифмической фазе роста в концентрации $4-5 \times 10^5$ кл/мл; концентрация антител в культуральной жидкости составляет 10-100 мкл/мл.

В случае наработки антител *in vivo* для получения асцита мышам предварительно вводят внутривенно 0,5 мл пристана, а концентрация (титр) антител в 100-1000 раз превышает их титр в культуральной жидкости.

С целью концентрирования моноклональные антитела преципитируют, высаливают сульфатом аммония; для очистки используется аффинная или ионообменная хроматография.

Для определения специфичности антител применяются различные серологические реакции – иммуноферментный анализ, реакция иммунофлюоресценции и др.

Полученные моноклональные антитела являются идентичными по всем параметрам – по классу молекул иммуноглобулинов, его типу, специфичности, avidности, аффинности.

– применение моноклональных антител

- ◆ Изготовление тест-систем для диагностики инфекционных болезней в серологических реакциях (ИФА, РИФ, РИА и др.);
- ◆ В гематологической практике для идентификации поверхностных маркеров гемопоэтических клеток и маркирования субпопуляций нормальных и малигнизированных клеток, обуславливающих развитие того или иного гематологического заболевания;
- ◆ При трансплантации аллогенного костного мозга донорские клетки обрабатывают моноклональными антителами против Т-лимфоцитов, чтобы предотвратить реакцию «трансплантат против хозяина»;
- ◆ Присоединение молекул лекарственных веществ к моноклональным антителам, специфичным по отношению к белкам, находящимся на поверхности строго определенных клеток, например опухолевых, облегчает доставку лекарственных средств (рис.31);

◆ В современной фармпромышленности моноклональные антитела используются для очистки лекарственных препаратов;

◆ При расшифровке антигенной структуры субпопуляций компетентных клеток, особенно Т-лимфоцитов, обладающих различными иммунорегулирующими функциями. Далее, это исследование иммунорегуляторных гормонов – интерлейкинов, интерферонов и других моно- и лимфокинов.

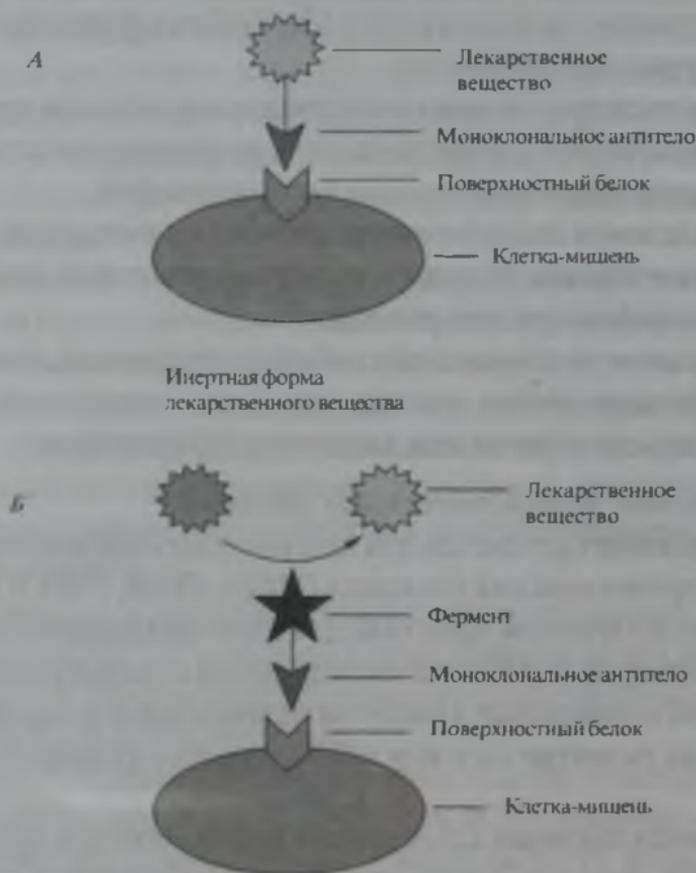


Рис. 31. Схематическое изображение системы целевой доставки лекарственного вещества, основанной на использовании моноклональных антител. А. Молекула лекарственного вещества присоединена к моноклональному антителу. Б. К моноклональному антителу присоединен фермент, превращающий инертную форму лекарственного вещества в активную только в непосредственной близости от клетки-мишени. В обоих случаях моноклональное антитело связывается с одним специфическим белком на поверхности клетки-мишени.

3. Клональное микроразмножение растений

Достижения в области культуры клеток и тканей привели к созданию принципиально нового *метода вегетативного размножения – клонального микроразмножения*

Это получение в условиях *in vitro*, в пробирке, неполным путем растений, генетически идентичных исходному экземпляру. В основе метода лежит уникальная способность клетки, самых различных специализированных тканей, помещенных на питательную среду в стерильных условиях реализовать присущую ей тотипотентность, т.е. под влиянием экзогенных воздействий давать начало целому растительному организму.

Первые достижения в области клонального микроразмножения были получены в конце 50-х годов XX столетия французским ученым Ж. Морелем, которому удалось получить первые растения-регенеранты орхидей. Успеху Ж. Мореля в микроразмножении способствовала уже разработанная к тому времени техника культивирования апикальной меристемы растений в условиях *in vitro*. Как правило, исследователи в качестве первичного экспланта использовали верхушечные меристемы травянистых растений: гвоздики, хризантемы, подсолнечника, гороха, кукурузы, одуванчика, салата и изучали влияние состава питательной среды на процессы регенерации и формирования растений.

Для обозначения растений, полученных бесполом размножением, в 1903 году Уэбер из министерства сельского хозяйства США предложил термин «клон» (греч. klon-черенок или побег, пригодный для размножения растений). Предполагается, что отпрыски растения, размножаемого неполным путем, не являются индивидуальностями. Они лишь части (клоны) материнской особи, идентичны ей и между собой.

Таким образом, *клональное микроразмножение – это использование техники in vitro для быстрого неполного получения растений, идентичных исходному.*

Тканевые и клеточные культуры растений наряду с применением для быстрого клонального микроразмножения и оздоровления растений используются при получении промышлен-

ным способом ценных биологически активных веществ растительного происхождения, а также трансгенных растений на основе рекомбинантных ДНК-технологий.

Методы клонального микроразмножения.

Существует несколько методов клонального микроразмножения. Исходя из особенностей морфогенеза при культивировании эксплантов, их реакции на изменение условий выращивания, конечных результатов клонального микроразмножения выделяют следующие методы (В.С. Шевелуха, 2003):

- активация развития уже существующих в растении меристем (апекс стебля, пазушные и спящие почки и интеркамерные зоны стебля);
- индукция возникновения адвентивных почек непосредственно тканями экспланта;
- индукция соматического эмбриогенеза;
- дифференциация адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусных тканях.

Эти методы можно объединить в два типа культивирования ткани растений *in vitro* (Г.Ж. Валиханова, 1996):

– первый тип растений получается в результате активации существовавших в интактном растении меристем (апекс стебля, пазушные и спящие почки). Эти растения, возникшие из меристем, генетически полностью идентичны родительским формам, так как апексы в условиях культуры в большинстве случаев генетически стабильны;

– второй тип растений получается в результате индукции возникновения почек или эмбриоидов. Эти растения, полученные из специализированных и каллусных клеток, характеризующихся генетической изменчивостью в культуре, могут несколько отличаться от родительских. Такой путь можно применять только к тем растениям, у которых каллус отличается генетической стабильностью или вариабельность между растениями – регенерантами не превышает уровня естественной изменчивости.

Почки и эмбриоиды могут образовываться из специализированных тканей экспланта (тканей репродуктивных органов,

эпидермиса, субэпидермальных тканей, мезофилла листа и т.д.) либо из каллусной ткани, выросшей из клеток экспланта.

Итак, основным методом, используемый при клональном микроразмножении растений, – это *активация развития уже существующих в растении меристем*. Еще в 1949 году было установлено, что апикальная меристема представляет собой небольшой участок не более 0,1–0,2 мм, расположенный на кончике стебля и состоящий из недифференцированных клеток; участок постоянно растет и образует органы растения. Меристематическая ткань растения непрерывно поддерживается в эмбрионально активном состоянии. Она устойчива к генетическим изменениям, возможно, вследствие высокой активности систем репарации ДНК.

В более нижних слоях дифференцирующиеся клетки меристемы образуют прокамбий, дающий начало пучкам проводящей системы. Известно, что успех клонального микроразмножения зависит от размера меристематического экспланта, чем больше листовых зачатков и тканей стебля, тем легче идет процесс морфогенеза, заканчивающийся получением целого, нормального пробирочного растения.

Одним из путей активации развития уже существующих в растении меристем является добавление в питательную среду веществ цитокининового типа действия, индуцирующих развитие многочисленных пазушных побегов. Как правило, в качестве цитокининов используют β -бензил-аминопурин (БАП) или β -фуруриламинопурин (кинетин). Клетки меристемы делятся и образуют маленькое растение с 5–6 листочками. Выросший за несколько недель стебель разрезают на 5–6 микрочеренков, т.е. побеги отделяют от первичного материнского экспланта и вновь культивируют на свежеприготовленной питательной среде, стимулирующей пролиферацию пазушных меристем и возникновение побегов более высоких порядков.

Для каждого вида растений, размножаемого таким путем, подбор благоприятных условий требует нескольких лет работы. Но преимущества значительны: так, при культивировании меристемы куста малины *in vitro* удается получить потомство

численностью до 50 тыс. растений, тогда как обычная техника черенкования обеспечивает получение только 50 растений в год; культура меристемы персикового миндаля, который служит подвоем для прививок и с большим трудом размножается при использовании обычной методики, позволяет получить 1 млн. растений в год.

В настоящее время этот метод широко используется в производстве безвирусного посадочного материала сельскохозяйственных культур как технических (сахарная свекла, хмель, табак, топинамбур, стахис), так и овощных (томаты, картофель, огурец, перец, тыква, спаржа и др.). Для некоторых сельскохозяйственных культур, таких, как картофель, технология клонального микроразмножения поставлена на промышленную основу. Применение метода активации развития существующих в растении меристем позволяет получать из одной меристемы картофеля более 10^5 растений в год, причем технология предусматривает получение в пробирках микроклубней ценного, безвирусного семенного материала (Г.Ж. Валиханова, 1996).

Второй путь клонального микроразмножения из меристематической ткани – это *индукция возникновения адвентивных почек или придаточных побегов* непосредственно тканями культивируемого экспланта. Адвентивные почки, по-видимому, формируются из поверхностных слоев меристематических клеток (эпидермальные или субэпидермальные). Ускорение таких придаточных побегов ведет к образованию целых растений. Образование адвентивных почек можно добиться почти из любых органов и тканей растения (изолированного зародыша, листа, стебля, семядолей, чешуек и донца луковицы, сегментов корней и зачатков соцветий). Этот процесс, как правило, происходит на питательных средах, содержащих один цитокинин или в сочетании с ауксином. В качестве ауксина в этом случае наиболее часто используют β -индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) или α -нафтилуксусную кислоту (НУК). Это наиболее распространенный метод микроразмножения высших растений (нарциссы, гладиолусы, тюльпаны, лилии, капуста цветная, качанная, чеснок, томаты, салат, цикорий, петунья). Этот

метод чаще используется при размножении луковичных растений, которые в естественных условиях размножаются очень медленно.

Третий путь, используемый в технологии клонального микроразмножения связан с дифференциацией из соматических клеток, из экспланта зародышеподобных структур или эмбриоидов – это *соматический эмбриогенез*. Формирование эмбриоидов в культуре тканей происходит в два этапа. На первом этапе клетки экспланта дифференцируются за счет добавления в питательную среду ауксинов, как правило, 2,4 – дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) и превращаются в эмбриональные. На следующей стадии необходимо заставить сформировавшиеся клетки развиваться в эмбриониды, что достигается уменьшением концентрации ауксина или полного его исключения из состава питательной среды.

Ко второму типу культивирования ткани растений *in vitro* наряду с соматическим эмбриогенезом относится и путь дифференциации адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной ткани. Каллусная клетка, в результате деления которой возникает каллусная ткань или каллус, представляет один из типов клеточной дифференцировки, присущей высшему растению. Для растения каллус является тканью, возникшей в исключительных обстоятельствах (обычно при травмах) и функционирующей непродолжительное время. Эта ткань защищает место поранения, накапливает питательные вещества для анатомической регенерации утраченного органа.

Для получения культивируемых каллусных клеток фрагменты тканей разных органов высших растений (экспланты) помещают на искусственную питательную среду *in vitro* в пробирки, колбы, чашки Петри. Процесс получения первичного каллуса и поддержание пересадочной культуры требуют строго стерильных условий. Часто эксплант, используемый для получения каллуса, является фрагментом органа и включает ткани, клетки которых различно дифференцированы. Так, взятый целиком фрагмент стебля имеет в своем составе клетки – эпидермальные, первичной коровой паренхимы, камбия и сосудистой системы, серд-

цевинной паренхимы. В разных условиях культивирования и в зависимости от различий в физиологическом состоянии – исходного растения можно наблюдать преимущественную пролиферацию клеток камбия и его молодых дериватов, коры и сердцевинной паренхимы. Различное тканевое происхождение первичных каллусных клеток является одной из причин гетерогенности культуры каллусной ткани.

При благоприятных условиях каллус начинает активно делиться, формирует меристематические очаги и дает начало либо почке, либо эмбриониду. Учитывая генетическую нестабильность каллусных клеток при культивировании *in vitro* лучше использовать первичный каллус. При этом период неорганизованного роста каллуса должен быть как можно короче.

Вместе с тем использование каллусной ткани при клональном микроразмножении имеет и положительные стороны, преимущества. Во-первых, он является эффективным и экономически выгодным, так как в процессе размножения из каждой индивидуальной каллусной клетки при благоприятных условиях культивирования может сформироваться адвентивная почка, дающая начало новому растению. Во-вторых, в ряде случаев он является единственно возможным способом размножения растений в культуре тканей. В третьих, представляет большой интерес для селекционеров, так как растения, полученные данным методом, различаются генетически и морфологически. Это дает возможность селекционерам проводить отбор растений по хозяйственно – важным признакам и оценивать их поведение в полевых условиях. Это метод целесообразно применять лишь к тем растениям, для которых показана генетическая стабильность каллусной ткани, а варибельность между растениями – регенерантами не превышает уровня естественной изменчивости. Через каллусную культуру были размножены: сахарная свекла, кукуруза, рис, пшеница, подсолнечник, лен.

Преимуществами клонального микроразмножения растений в сравнении с традиционными методами являются:

1) значительно более высокий коэффициент размножения, достигающий 10^5 - 10^6 мериклонов в год, при 5-100 растениях от

одного, обычно получаемых традиционно за этот же срок. Из одного растения герберы, земляники, хризантемы, розы при размножении их посредством культуры тканей можно получить в год свыше 1 млн. растений. Если коэффициент размножения для травянистых, цветочных растений равен $10^5 - 10^6$, для кустарниковых древесных – $10^2 - 10^4$, для хвойных – 10^4 . Так из одной почки яблони за 8 месяцев можно получить до 60 тыс. побегов. При культивировании меристемы куста малины *in vitro* удастся получить до 50 тыс. растений в год;

2) миниатюризация процесса, приводящая к экономии площадей, занятых маточным и размножаемыми растениями;

3) возможность проведения работ в любой сезон года;

4) оздоровление посадочного материала от патогенных микроорганизмов, вирусов (при использовании в качестве первичного экспланта меристемной культуры);

5) размножение растений, трудно размножаемых традиционными способами.

а) *Этапы и техника клонального микроразмножения.*

*Первый этап – это выбор растения донора, изолирование и стерилизация экспланта, создание условий для его роста на питательной среде *in vitro* (рис. 32). Успех зависит от правильного выбора экспланта с учетом условий выращивания и развития донорного растения.*

Стерилизация растительной ткани – осуществляется ртутьсодержащими растворами (сулема или диацид. 0,1-0,2%) или хлорсодержащими (хлорамины 10-15%, гипохлорит натрия или кальция 5-10%) в течение 5-10 мин для нежных, легко повреждаемых тканей растений и 10-12 мин – для тканей, имеющих более плотную оболочку. После этого растительные ткани необходимо тщательно промыть в стерильной дистиллированной воде, как правило, в трех порциях и перенести на заранее приготовленную стерильную питательную среду. Если исходную стерильную культуру экспланта получить трудно, рекомендуется вводить в состав питательной среды антибиотики (тетрациклин, бензилпенициллин и др.) в концентрации 100-200 мг/л.

Для культивирования используют среду Мурасиге и Скуга, содержащую минеральные соли, различные биологически активные ве-

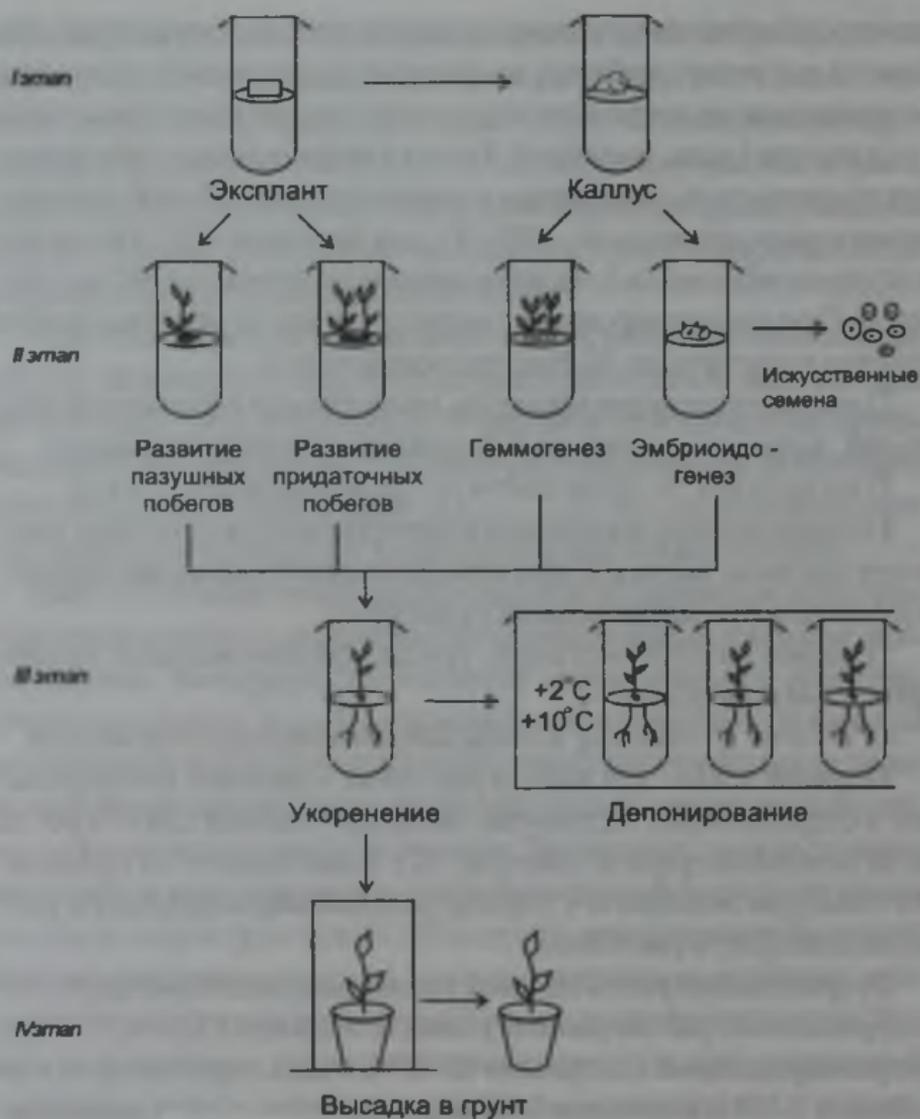


Рис. 32. Этапы клонального микроразмножения
(Г.Ж. Валиханова, 1996)

щества и стимуляторы роста (ауксины, цитокинины) в различных сочетаниях в зависимости от экспланта. В случае, когда наблюдается ингибирование роста первичного экспланта за счет выделения им в питательную среду токсичных веществ (фенолов, терпенов и других вторичных соединений), усилить его рост можно, используя антиоксиданты. Продолжительность первого этапа –

от 1 до 2 месяцев, в результате которого наблюдается рост меристематических тканей и формирование первичных побегов.

Второй этап – собственно микроразмножение путем:

а) стимуляции развития всех пазушных почек экспланта в результате подавления апикального доминирования как первичных, так и всех вновь возникающих побегов;

б) микрочеренкование побега, сохраняющего апикальное доминирование;

в) стимуляции образования адвентивных почек тканями листа, стебля, чешуйками и донцом луковиц, корневищем, зачатками соцветий.

На этом этапе необходимо добиться получения накопительного количества мериклонов, учитывая при этом, что с увеличением субкультивирований увеличивается число растений – регенерантов с ненормальной морфологией и возможно образование растений – мутантов. Вновь используется среда Мурасиге и Скуга с соответствующими регуляторами роста. Из цитокининов наиболее часто используют бензиламинопури (БАП) в концентрациях от 1 до 10 мг/л, а из ауксинов – ИУК и НУК в концентрациях до 0,5 мг/л.

Третий этап – укоренение размноженных побегов и адаптация пробирочных растений к условиям in vitro. Необходимо обеспечить развитие нормальной корневой системы. Для этого в питательную среду добавляют ризогенный фактор – ауксины. После появления корней растения либо подготавливают к высадке в почву, либо помещают на хранение при пониженных температурах (депонирование). Это задерживает развитие растений и позволяет сохранить их длительное время, используя затем по мере возможности.

На этом этапе, как правило, меняют основной состав среды: уменьшают в два-четыре раза концентрацию солей по рецепту Мурасиге-Скуга, уменьшают количество сахара до 0,5-1% и полностью исключают цитокинины, оставляя лишь ауксин. В качестве стимулятора корнеобразования используют β -индолил-3-масляную кислоту (ИМК), ИУК или НУК.

Укоренение микропобегов проводят двумя способами:

1) выдерживание микропобегов в течение нескольких часов (2-24 ч) в стерильном концентрированном растворе ауксина (20-50 мг/л) и последующее их культивирование на агаризованной среде без гормонов или непосредственно в подходящем почвенном субстрате;

2) непосредственное культивирование микропобегов в течение 3-4 недель на питательной среде, содержащей ауксин в невысоких концентрациях (1-5 мг/л, в зависимости от объекта).

Четвертый этап – выращивание извлеченных из культуральных сосудов растений в условиях теплицы в почве или искусственном субстрате.

Подготовка к реализации или высадке в поле. Повышают влажность воздуха и увеличивают интенсивность освещения. Растения с гетеротрофного питания переходят на автотрофный.

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. Корни отмывают от остатков агара и высаживают в почвенный субстрат, предварительно простерилизованный при 80-90°C в течение 1-2 ч. Для большинства растений в качестве субстрата используют в разных соотношениях: торф, песок, перлит, дерновую почву. Пересаженные растения помещают в теплицы с регулируемым температурным режимом (20-22°C), освещенностью не более 5 тыс.лк. и влажностью 65-90%. Через 20-30 дней после посадки хорошо укоренившиеся растения подкармливают минеральными солями.

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 гибель растений. 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 питательными веществами, водой, биологически активными веществами, а также в защите растений от патогенов. Заражение растений микоризными грибами, улучшая снабжение их азотом, в 1,5-2 раза увеличивает приживляемость и повышает прирост надземной биомассы растения.

б) *Факторы, влияющие на процесс клонального микроразмножения растений*

Генотип растения во многом определяет успех работы по микроразмножению, так как, скорость регенерации растений *in vitro* зависит от вида. Так, двудольные травянистые растения обладают более выраженной способностью к регенерации, чем однодольные и древесные растения. Для каждого вида растения подбирается наиболее эффективный метод регенерации. Растения, из которых изолируют экспланты, должны быть здоровыми, их выращивают в теплицах при невысокой влажности воздуха, с ограниченным поливом, избегая забрызгивания листьев. Выбор экспланта играет очень важную роль. Лучше всего использовать меристематические активные ткани и органы: верхушки побегов, пазушные почки меристемы. Они хорошо выживают в культуре, обладают высокой скоростью роста и тотипотентностью.

Физиологические параметры, такие как возраст исходного растения, размер первичного экспланта, время (сезонность) изоляции экспланта – оказывают существенное влияние. С увеличением возраста исходного материала, как правило, снижается способность побегов и черенков к укоренению. Ткани и органы, изолированные в момент вегетации растений, обладают более высокой чувствительностью к составу питательной среды и способны с высокой частотой образовывать адвентивные почки, формировать побеги и укореняться, чем ткани взятые в иные сроки.

Условия культивирования – сбалансированность питательной среды по минеральным солям, углеводам, фитогормонам, витаминам и др. Из углеводов часто используется 3% сахаразы, также глюкоза, фруктоза, галактоза и др.

pH питательной среды варьирует в пределах 5,0-5,8 в зависимости от объекта культивирования, с учетом кислотности почв естественного произрастания исследуемых растений.

Температура оказывает значительное влияние на рост и регенерацию изолированных тканей растений, способствуя активации метаболических процессов. Для большинства растительных тканей температурный оптимум составляет 23-26°C. Температурный режим зависит, главным образом, от вида растений. Так, например, для тропических растений оптимальная температура выращивания приближается к 27°C, для растений альпийских лугов – 18-20°C, для большинства других 25°C. При клональном микроразмножении пробирочные растения выращивают в климатических камерах, где поддерживается 16-часовой фотопериод и 70%-ная относительная влажность воздуха.

Обычно изолированные клетки растений выращивают при освещении люминесцентными лампами с учетом требований материнского растения к интенсивности и фотопериоду. Мура-сиге рекомендует на первом и втором этапах клонального микроразмножения растений культивировать ткани при 1,5 тыс. лк. и 14-16-часовом фотопериоде, такие условия освещения способствуют инициации побегов и корней у большинства растений. Увеличение освещенности способствует интенсивному побегообразованию.

в) Применение клонального микроразмножения

Клональное микроразмножение является новым перспективным способом вегетативного размножения растений, позволяющим получать генетически однородный, оздоровленный посадочный материал, иметь высокий коэффициент размножения, сокращать селекционный процесс, проводить работы в течение круглого года, экономя при этом площади, необходимые для выращивания растений. Метод позволяет получать высококачественный посадочный материал, применение которого значительно повышает урожай и улучшает его качество.

Клональное микроразмножение применяется для разведения декоративных (орхидеи, гвоздики, георгины, нарциссы, розы, сирень), овощных (картофель, томаты, лук, чеснок, различные виды капусты), плодово-ягодных (земляника, малина, смородина, виноград, яблоня, вишня, слива, персик) культур. Среди злаковых этим методом размножают в промышленных масштабах только сахарный тростник и бамбук. Зерновые культуры размножаются *in vitro* с трудом, и этот метод используется в селекционных работах в небольших масштабах.

Во многих странах мира биоиндустрия клонального микроразмножения поставлена на промышленную основу. 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. Размножение и получение безвирусного посадочного материала гвоздики, хризантемы, розы и других ведется в цветоводческих хозяйствах «Элитга» Российской Федерации, в меристематическом производстве Республиканского комплекса «Крымзеленстрой».

Следует назвать еще две возможные области применения клонального микроразмножения. Первое – это быстрое клональное размножение *in vitro* лучших экземпляров взрослых лесных деревьев, особенно хвойных. Второе – путем клонального микроразмножения создание коллекций сортов и линий, необходимых для сохранения генофонда растений, для проведения научно-исследовательских работ.

IX. BIOTEХНОЛОГИЧЕСКАЯ ПРОДУКЦИЯ

1. Биотехнологическая продукция микробного происхождения

Биологически активные соединения, полученные в результате микробиологического синтеза и биотрансформации (ферменты, антибиотики, аминокислоты, витамины и др.) применяются в различных отраслях промышленности, сельском хозяйстве, медицине и ветеринарии.

Микроорганизмы вырабатывают несколько сотен ценных биологически активных соединений; широкомасштабное производство налажено по выпуску этанола, ацетона, уксусной, лимонной и молочной кислот, ферментов и аминокислот. Биологически активные вещества синтезируются и химическим путем. Преобладание биологического или химического пути синтеза органических соединений определяется экономической целесообразностью, наличием дешевого сырья, качеством и производительностью технологии. Об этом свидетельствует изречение химика-органика: «О всевышний, я, смирив гордыню, молю, чтоб в синтезах отныне я совершенства мог добиться и в том с бактерией сравниться».

Ферменты

Наиболее широко применяются ферменты, выделенные из мицелиальных грибов (амилаза, глюкоамилаза, декстраназа, протеиназы, пектиназы, целлюлазы; продуценты – *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* и др.), дрожжей, актиномицетов и бактерий. Также в промышленности используются ферменты растительного и животного происхождения (табл. 22).

В пищевой промышленности применяются:

– амилаза, глюкоамилаза, глюкоизомераза, (пивоварение, хлебопечение, получение растворимого крахмала, декстрина, патоки, глюкозо-фруктозных сиропов). Продукты из овощей и фруктов, полученные с помощью амилаз, содержат больше сахара и лучше усваиваются, особенно детьми. В хлебопечении амилазы ускоряют процесс созревания теста и улучшают каче-

Ферменты используемые в промышленности

<i>Фермент</i>	<i>Принцип действия</i>	<i>Область использования</i>
Протеиназы, липазы, амилазы микробиологического происхождения	Используются в жидкой фазе в процессе стирки, например, машинная стирка для удаления крахмала, жира и белков	Биологические детергенты
Грибная α -амилаза, протейназа	Гидролиз крахмала в муке для образования сбраживаемых сахаров; производство сухарей с низким содержанием белка	Выпечка хлеба
Ферменты ячменя	Гидролиз крахмала и белков для образования сбраживаемых сахаров, аминокислот и пептидов	Производство пива
Протеиназы, глюконазы, амилоглюкозидаза	Ограниченный гидролиз полисахаридов и белков, усовершенствование фильтрационного процесса, удаление мутности при хранении низкокалорийного пива	Производство пива
Реннин (высушенный фермент), липазы, лактаза микробиологического происхождения	Производство сыра специфическим гидролизом молочного белка, быстрое созревание сыра («Рокфор»), разложение лактозы на глюкозу и галактозу	Переработка молочных продуктов
α -амилаза, глюкоамилаза	Гидролиз крахмала до глюкозы и низкомолекулярных сбраживаемых сахаров	Переработка крахмала
Иммобилизованная форма глюкозоизомеразы	Изомеризация глюкозы во фруктозу, сиропы с высоким содержанием фруктозы	Переработка крахмала
Грибные и бактериальные амилазы	Удаление крахмала из тканей (взамен ранее употребляемых химикатов)	Шелкоткацкое производство
Протеолитические ферменты из экскрементов собак и голубей	Смягчение кожи и удаление белков	Производство кожи
Трипсин и аналогичные трипсину ферменты	Заменяют протеолитический фермент, используемый в производстве кожи	Производство кожи

ство хлеба. Глюкоамилаза в пивоварении используется для удаления остатков декстринов из пива;

– сахараза (инвертаза) используется в кондитерской промышленности, превращает сахарозу в глюкозу и фруктозу; она предупреждает кристаллизацию сахарозы при высокой концентрации в продукте;

– лактаза, применяется при получении безлактозного молока. После обработки лактазой молоко приобретает лучшие вкусовые качества. Кроме того, некоторая часть населения не может употреблять молоко из-за наличия в нем лактозы, вызывающей у них аллергические реакции;

пектиназы, при производстве фруктовых соковых концентратов и экстрактов имеются трудности в процессе фильтрации и осветления, связанные с присутствием пектиновых полисахаридов, образующих мутность. Пектиназы разрушают эти комплексы, облегчают экстракцию, осветляют фруктовые и ягодные соки, повышают выход виноградного, грушевого, яблочного соков. Применение пектиназ особенно эффективно при производстве сока из плодовых ягод, содержащих много пектина (черная смородина, крыжовник, слива и др.)

– протеазы, используются в процессе приготовления пива: во время затирания для повышения выхода экстракта и уровня аминного азота в сусле и для удаления холодного помутнения пива.

В сельском хозяйстве применяются:

– протеазы и целлюлазы для обработки кормов с целью повышения их усвояемости. Основной компонент кормов сельскохозяйственных животных – это растительная продукция (зерно, силос, грубые корма и др.), содержащие довольно много трудно перевариваемых веществ – клетчатка, лигнин, гемицеллюлоза. Даже у жвачных животных, содержащих в преджелудке (рубце) активные штаммы целлюлозоразлагающих микроорганизмов, клетчатка переваривается на 40-65%. Поэтому добавление в кормовые рационы молодняка сельскохозяйственных животных и птиц таких ферментов, как амилосубтилин, протосубтилин, глюкамоварин, целловириндин, амилоризин и других, активно расщепляющих кормовой субстрат

повышает их упитанность, оказывает определенное лечебно-профилактическое действие при кишечных инфекциях.

При силосовании соломы, бобовых трав, получении соломоконцентратов используют гидролизаты вышеперечисленных ферментов. Силосование как метод биологической консервации различных кормовых растений основан на молочнокислом брожении. Биологическое консервирование исключает введение химических консервантов, продукция не подвергается большим термическим воздействиям. Сохранение продукта достигается благодаря развитию в нем молочнокислых бактерий. Соки кормовых растений являются питательной средой для *Bacillus sp.*, *Clostridium sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Streptococcus sp.* и др.

Используемые в сельском хозяйстве микробные ферментные препараты содержат комплекс ферментов. К примеру, амилоризин – это высушенная культура грибов *Aspergillus oryzae*, содержащая β -амилазу, декстраназу, мальтазу, глюкоамилазу, кислую фосфатазу и гемицеллюлазу.

В медицинской практике применяются: протенназы – протеолитические ферменты. они назначаются при лечении различных воспалительных заболеваний внутренних органов (панкреатиты, эндокардиты и др.), тромбозов, а также для разрушения некротической ткани, быстрого очищения и заживления раневой поверхности.

Антибиотики

Антибиотики микробного происхождения применяются в пищевой промышленности, ветеринарии, растениеводстве и особенно востребованы в медицине при лечении инфекционных заболеваний (табл. 23).

Низин (продуцирует *Streptococcus lactis*) – применяется при консервировании томатов, зеленого горошка, цветной капусты и др.; при сохранении твердых и мягких сыров.

Субтилин (продуцирует *Bacillus subtilis*) используется при консервировании овощей. При его применении значительно смягчается их термическая обработка, что способствует сохра-

**Важнейшие классы антибиотиков терапевтического назначения
(по Н.С. Егорову, 1979; Д. Ланчини, Ф. Паренти, 1985)**

<i>Класс</i>	<i>Типичные антибиотики</i>	<i>Продуценты</i>	<i>На кого действует</i>	<i>Механизм действия</i>	<i>Трудности терапевтического применения</i>
Беталактамы	Пенициллины, цефалоспорины	Грибы родов <i>Penicillium</i> , <i>Cephalosporium</i> ,	Грамположительные и грамотрицательные бактерии	Нарушение синтеза клеточной стенки	Аллергические реакции
Аминогликозиды	Стрептомицин, гентамицин, канамицин, тобрамицин, амикацин	Актиномицеты рода <i>Streptomyces</i> , бактерии родов <i>Micromonospora</i> , <i>Bacillus</i>	В основном грамотрицательные бактерии	Необратимое подавление белка	Токсическое действие на слуховой нерв и почки
Тетрациклины	Одноименные антибиотики	Актиномицеты рода <i>Streptomyces</i>	Грамположительные и грамотрицательные бактерии, риккетсии, хламидии, простейшие	Обратимое подавление синтеза белка	Распространение устойчивых штаммов
Макролиды	Антибактериальные: эритромицин	Актиномицеты рода <i>Streptomyces</i>	Грамположительные бактерии	То же	Токсичность
	Противогрибковые и антипротозойные: полиены	То же	Грибы, некоторые простейшие	Нарушение плазматической мембраны	
Полипептидные и депептидные	Полимиксины, грамицидины, бацитрацины	Различные микроорганизмы	В основном грамотрицательные бактерии	Механизм действия различен	Высокая токсичность

нению витаминов, вкусовых качеств и консистенции консервируемого продукта.

Триходермин и трихоцетин (продуцирует *Trichoderma sp.*) используется для борьбы с корневыми гнилями овощных, зерновых и технических культур.

Используемые в пищевой промышленности антибиотики не должны применяться в медицине. Это связано с предупреждением процесса возникновения и распространения устойчивости к антибиотикам у болезнетворных для человека микроорганизмов.

Аминокислоты

Мировой уровень производства аминокислот достигает нескольких миллионов тонн. В наибольших количествах нарабатываются: L-глутаминовая кислота, L-лизин, DL-метионин, L-аспарагиновая кислота, глицин (табл. 24). Основные способы получения аминокислот: экстракция из белковых гидролизатов растительного сырья, химический синтез, микробиологический синтез.

Они применяются в основном в пищевой промышленности для улучшения вкуса и повышения питательной ценности продуктов.

При химическом синтезе аминокислот образуется трудно разделяемая рацематическая смесь L и D-форм. Практически сложно выделить из этой смеси биологически активные и потому пригодные для питания человека и животных L-формы.

При микробиологическом синтезе продуцируются только L-формы, в чистом виде.

Наиболее распространенные продуценты аминокислот – грамположительные бесспорные бактерии, относимые к родам *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*.

Глутаминовая кислота (*Corynebacterium glutamicum*) широко применяется как вкусовая добавка в пищевой промышленности и в кулинарии.

Лизин (*Corynebacterium sp.*, *Brevibacterium sp.*), используется как кормовая добавка в животноводстве, представляет собой порошок, полученный путем высушивания на распылительной сушилке культуральной жидкости продуцента лизина.

Способы производства аминокислот и их объем в Японии (по данным 1987 г.)

<i>Аминокислота</i>	<i>Способ производства</i>	<i>Объем производства, т/г</i>
Аланин	Ф, Х	150-200
Аргинин	М, Х, Г	100-300
Аспарагиновая кислота	Ф	1000
Аспарагин	Х, Г	10-50
Цитрулин	М, Х	10-50
Цистеин	Г	1-10
Цистин	Г	100-200
Глицин	Х	5000-6000
Глутаминовая кислота	М	100000
Гистидин	М, Г	100-200
Гомосерин	М	10-50
Оксипролин	Г	10-50
Глутамин	М	200-300
Изолейцин	М, Г	10-50
Лейцин	М, Г	50-100
Лизин	М	15000
Метионин	Х	60000-70000
L-метионин	М	100-200
Орнитин	М, Г	10-50
Фенилаланин	М, Х	50-100
Пролин	М, Г	10-50
Серин	М, Г	10-50
L-треонин	М	50-100
DL- L-триптофан	Х, Ф	100
Тирозин	М, Г	10-100
Валин	М	50-100
3,4-диоксифенилаланин (ДОФА)	Ф	0,1

Обозначения: ф – ферментативный синтез, х – химический синтез, м – микробиологический синтез, г – путем экстракции из белковых гидролизатов животного и растительного происхождения.

Органические кислоты

Лимонная кислота была впервые выделена из сока лимона, ее содержание составляет 7-9% от сухой массы. Вемер (1893 г.) показал, что лимонная кислота является метаболитом плесневых грибов родов *Penicillium* и *Mucor*. Из все органических кислот, применяемых в пищевой промышленности более всего производится лимонной кислоты (более 1 млн. тонн в год). Около 70% производимой кислоты используется в пищевой, 10-12% в фармацевтической, 18-20% в технической промышленности.

Использование лимонной кислоты в пищевой промышленности и в производстве напитков в качестве подсластителя обусловлено ее хорошей растворимостью, чрезвычайно низкой токсичностью и приятным кислым вкусом.

Столь же актуальна в промышленности уксусная кислота (уксус – слабый водный раствор уксусной кислоты). Обычно уксусную кислоту получают при сбраживании вина, солода, яблочного сидра штаммами *Acetobacter sp.* либо *Gluconobacter sp.* Уксусную кислоту также используют при получении медицинских препаратов, при растворении органических красителей, при производстве синтетических волокон и пластмасс.

Фиторегуляторы

Агат-25к – культура *Ps. aureofaciens*, АПС – культура анаэробных бактерий; НИКФАН – метаболиты грибов – эндофитов облепихи; Симбионт-1 – продукт метаболизма грибов эндофитов женьшеня и др. Повышают всхожесть семян сельскохозяйственных растений, ускоряют их развитие, повышают урожайность.

Витамины

B_{12} , B_2 , D – продуценты пропионово-кислые бактерии, плесневые грибы, сакшаромицеты; применяются в медицине, животноводстве и птицеводстве.

B_{12} – цианкобаламин (*Propionibacterium sp.*), применяется в медицине при лечении анемии, цирроза печени как гемопоэтический, ростовой фактор, благотворно воздействующий на

кровотворную функцию и на обмен белков, содержание аминокислот; в кормопроизводстве для повышения упитанности и профилактики кишечных инфекций у сельскохозяйственных животных и птиц. Снижение содержания витамина B_{12} в желтке яиц приводит к резкому снижению выводимости потомства.

B_2 – рибофлавин (*Aspergillus niger* – плесневые грибы, *Nocardia eritropolis* – актиномицеты) применяется в медицине и животноводстве.

D_2 – продуценты *Aspergillus sp.* и *Penicillium sp.* используется в медицине.

Каротиноиды

Получают из водорослей (*Chlorella sp.*), дрожжей (*Rhodotorula sp.*), актиномицетов (*Actinomyces sp.*). Бета-каротин-пигмент, широко используемый в пищевой промышленности, продуцирует *Blakeslea trispora* – муконовый гриб.

Полисахариды

Декстраны, гликаны, леваны, зимозан, продигиозан, хитин, маннаны и др., синтезируются псевдомонадами, кандидами, бациллами и другими микроорганизмами. Они используются в медицине как плазмозаменители крови, антикоагулянты, иммуностимуляторы, при разработке вакцин; в пищевой промышленности и сельском хозяйстве; в нефтеперерабатывающей и химической промышленности.

Биопестициды

Бактоларвицид, лепидоцид, энтеробактерин, дендробациллин и др., используются для защиты сельскохозяйственных растений, плодовыхгодных культур от чешуекрылых насекомых (белянок, совок, молей, шелкопрядов, гусениц, мошек и комаров). Наиболее часто при производстве пестицидных биопрепаратов используется *Bacillus thuringiensis*, продуцирующий токсин, который эффективно действует на насекомых вредителей; токсин безвреден для человека, животных и растений.

Биоудобрения

Азотобактерин, нитрагин, фосфобактерин и др. В 1896 г. в Германии Ноббе и Гильтнер изготовили коммерческий препа-

рат, содержащий смесь клубеньковых бактерий для девятнадцати видов бобовых – нитрагин. Современные азотобактерин и нитрагин представляют собой биомассу клубеньковых бактерий и азотобактера, к которым добавляют стабилизаторы (меласса и тиомочевина) и наполнитель (бентонит, почва); используются для обогащения почвы азотом. Фосфобактерин – биопрепарат, превращающий сложные органические соединения фосфора в простые, легкоусвояемые растениями.

Эубиотические препараты

Пропиолвит, пропиацид – на основе пропионовокислых и ацидофильных бактерий; применяются с целью профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний молодняка сельскохозяйственных животных и птиц.

Вакцины

Используются в медицине и ветеринарии, с целью профилактики инфекционных заболеваний. Это живые или аттенуированные (против туберкулеза – БЦЖ, против сибирской язвы – СТИ и др.), убитые или инактивированные (менингококковая, лептоспирозная и др.) и субъединичные или изготовленные из компонентов микробных клеток (холероген – анатоксин, противостолбнячный анатоксин и др.).

В Казахстане одним из крупных предприятий, занимающихся научными исследованиями и производством биопрепаратов для ветеринарии (вакцины, диагностикумы) является научно-исследовательский сельскохозяйственный институт (ныне – Научно-исследовательский институт проблем биобезопасности) Национального центра биотехнологии МОН РК (рис. 33).

Кормовой белок

Это белковая масса одноклеточных водорослей (*Spirulina sp.*, *Chlorella sp.*, *Scenedesmus sp.* и др.). Биомасса водорослей *Spirulina* легко переваривается желудочным соком, характеризуется высоким содержанием белков (до 50-70% сухой массы), сбалансированных по аминокислотному составу. Наряду с высоким содержанием белковых веществ в клетках водорослей довольно много синтезируются полиненасыщенных жирных кислот (являющихся, как и некоторые аминокислоты,



Рис. 33. Биопрепараты, выпускаемые Научно-исследовательским сельскохозяйственным институтом МОН РК (2003 год).

незаменимыми) и провитамина А – каротина. Каротина в биомассе водорослей в 7-9 раз больше, чем в травяной муке из люцерны, отличающейся высоким содержанием этого провитамина среди кормовых трав.

По своим питательным свойствам белки микроскопических грибов приближаются к белкам сои и мяса, вследствие чего могут использоваться не только для приготовления кормовых концентратов, но и как добавка в пищу человека (табл. 25).

Закваски

У каждого народа имеется хотя бы одно национальное блюдо, приготовленное путем молочнокислого брожения. В Арме-

Органические кислоты и образующие их организмы

Кислота	Источник углерода	Продуцент микроорганизм
Молочная	Крахмал, глюкоза	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Rhizopus oryzae</i>
Масляная	Крахмал, глюкоза	<i>Clostridium butyricum</i>
Пропионовая	Глюкоза	<i>Propionibacterium shermanii</i>
Глюконовая	Глюкоза	<i>Aspergillus niger</i>
Винная	Глюкоза	<i>Gluconobacter suboxydans</i>
Уксусная	Этанол	<i>Acetobacter aceti</i>
Итаконовая	Глюкоза	<i>Aspergillus terreus</i>
Янтарная	Глюкоза	<i>Bacterium succinicum</i>
Фумаровая	Глюкоза, парафин	<i>Rhizopus delemar</i> , <i>Candida hydrocarbofumarica</i>
Яблочная	Глюкоза, парафин	<i>Candida hydrocarbofumarica</i> , <i>Pichia membranaefaciens</i>
Лимонная	Меласса, сахароза	<i>Aspergillus niger</i>

нии широко применяют мацони, во Франции – сыры типа Рокфор, в Болгарии популярен кефир, в России – простокваша, в Казахстане – шубат и кумыс.

В качестве заквасок часто применяется симбиоз молочнокислых бактерий – *Lactobacillus sp.*, *Streptococcus sp.* и дрожжей – *Saccharomyces sp.* и *Torula sp.*

Так, при приготовлении кумыса используют сухую (кор – высушенный осадок кумыса) и жидкую (коже – кумыс) закваски, содержащие *L. casei*, *L. bulgaricus*, *Str. lactis*, *Torula sp.* В йогурте доминирует *L. bulgaricus*, сбраживающая глюкозу, галактозу и лактозу; в простокваше – *Str. lactis*; в ацидофильном молоке *L. acidophilus*.

При приготовлении мягких и твердых сыров в качестве закваски используются плесневые грибы (*Penicillium sp.*), пропионовокислые бактерии (*Propionibacterium shermanii*), придающие специфический вкус и аромат, образующие в сыре «глазки» из-за выделения ими углекислого газа.

2. Биотехнологическая продукция растительного происхождения

Растительное сырье в биопроизводстве

Наиболее широко растительное сырье используется в таких отраслях биотехнологии как пищевая промышленность и фармацевтика. К примеру, при производстве этанола используют сырье трех типов:

- ◆ сахаросодержащее, которое можно непосредственно сбраживать;
- ◆ крахмалистое, которое предварительно подвергают кислотному или ферментативному гидролизу;
- ◆ целлюлозосодержащее сырье, которое гидролизовать трудно.

К первому типу сырья принадлежат меласса, сок сахарной свеклы и сахарного тростника. Меласса – это побочный продукт сахарного и крахмально-паточного производства. Основной сахар сахароза (45-50% сухой массы), меласса также содержит азотсодержащие и без-азотистые органические соединения, минеральные вещества. При подготовке к ферментации мелассу разбавляют водой и подкисляют; иногда к ней добавляют микроэлементы, а удаляют ионы железа и т.п.

Главное сырье второго типа – ячменное сусло, злаковое сусло, кукурузный сироп, рис, рожь, а также картофель. К примеру основной кукурузы является крахмал. Кукурузу предварительно проваривают, чтобы сделать крахмал растворимым; затем крахмал превращают в сахар под действием ферментов.

Третий тип сырья – целлюлозосодержащее – наиболее обильное, ибо это отходы бумажной промышленности, злаковая солома, пустые початки кукурузы. В таблицах 26 и 27 приведено растительное сырье, используемое в производстве алкогольных и безалкогольных напитков.

Лекарственные растения (фитопрепараты)

Около 35-40% лекарственных средств в мире имеют растительное происхождение. Лекарственные растения содержат комплекс биологически активных соединений (флавоноиды, тер-

Ферментированные, недистиллированные алкогольные и безалкогольные напитки

<i>Субстрат</i>	<i>Напиток</i>	<i>Страна</i>
Ячмень, злаковые (крахмал)	Пиво Эль	Центральная Европа Бельгия.
Ячмень, рис, рожь, сахарная свекла	Квас	Германия, Канада
Просо	Боуза Тумба	Россия, Украина, Германия
Рис, фрукты, виноградные выжимки (грапа, чача)	Водка	Украина
	Саке	Индия
	Сонт	Ближний Восток,
	Ганг - чу	Индия, Россия, Италия, Грузия
Рис		Япония
Виноград	Вино	Индия Китай
		Ближний Восток,
Яблоко		Европа, Китай,
Мед	Сидр	Австралия, ЮАР, Южная Америка, США
		Великобритания, Франция Великобритания, Россия

Таблица 27

Ферментированные крепкие напитки

<i>Субстрат</i>	<i>Продукт</i>	<i>Субстрат</i>	<i>Продукт</i>
Меласса	Ром	Ячмень	Виски
Агаза	Текила	Кукуруза, рожь	Бурбон, виски
Слива	Сливовица	Картофель, рожь, пшеница	Водка
Вишня	Кирги	Ячмень, картофель	Аквавит
		Рис	Китайский бренди
Виноград	Коньяк (бренди)	Груша	Грушевый бренди

пены, стероиды, эфирные масла, глицеризиновая кислота, кумарины, алкалоиды, лигнаны и др.) в небольших концентрациях.

Поэтому они обладают мягким, многосторонним лечебным действием – антиоксидантным, противовоспалительным, иммуномодулирующим, антимикробным и др.

Преобладают фитопрепараты в виде водных и этанольных экстрактов из тканей растений, а также биомасса растительных клеток, культивируемых в биореакторах и обладающие:

- ◆ противовоспалительным: солодка, девясил, ромашка, шалфей, кызылмай и др.;
- ◆ антимикробным: календула, зверобой, чистотел, эвкалипт, шипалы май и др.;
- ◆ иммуностимулирующим: женьшень, лимонник китайский, элеутерококк, каланхоэ, Melissa лекарственная, горец птичий и др.;
- ◆ антиоксидантным: хитозан, солодка, салсоколлин, диаскорейя;

Налаживается производство продуктов, полученных в культуре клеток высших растений (табл. 28).

Таблица 28

**Экономически важные продукты,
полученные в культуре высших растений
(по Р.Г. Бутенко, 1999)**

<i>Традиционные растительные продукты</i>	<i>Новые активные вещества</i>	<i>Продукты биотрансформации</i>
Алколоиды	Ингибиторы фитовирусов	Метилдигоксин, дигоксин
Стероиды Терпены и терпеноиды	Антиканцерогены, компоицин	Ментол
Бетанины Гликозиды, полифенолы Полисахариды, эфирные масла Натуральные красители (пигменты) Убихинон, инсектициды вкусовые добавки латекс	ингибиторы протеиназ необычные белки	неоментол гераниол нерол цитронеллол

Пектины. Пектиновые вещества – это групповое обозначение сложных коллоидных углеводов, которые встречаются в растениях и в приготовленных из них продуктах и состоят преимущественно из остатков галактуроновой кислоты. Пектины в промышленных масштабах применяются в основном при производстве джемов и мармеладов.

Таумантин – соединение белковой природы, получают экстракцией из плодов растения *Thaumatococcus danielli*. Из всех известных сегодня сахарозаменителей это соединение самое сладкое. Сахарозаменители используют в производстве различных напитков (алкогольных, безалкогольных), варений, джемов, конфет, жевательных резинок и других сладких продуктов.

Каротиноиды – это наиболее многочисленная и широко распространенная группа природных пигментов растительного и микробного происхождения. Бета-каротин применяется в медицине, пищевой промышленности и сельском хозяйстве.

Фиторегуляторы – гетероауксин (индолил - 3 уксусная кислота) для замачивания черенков плодовых и ягодных культур перед высадкой в почву; СИЛК (тритерпеновые кислоты) – для опрыскивания томата, картофеля, сои в фазе цветения и др.

Трансгенные растения. Растения, животные и микроорганизмы, модифицированные генно – инженерными методами принято называть генетически измененными, а продукты их переработки для пищевых потребностей – трансгенными пищевыми продуктами или генетически модифицированными источниками пищи (ГМИ). Это трансгенная соя, кукуруза, пшеница, томат и др.

Съедобные вакцины. При инфекционных заболеваниях создание иммунитета является эффективной профилактической мерой; а при кишечных инфекциях особо важно создание местного иммунитета, т.е. стимуляция выработки секреторных иммуноглобулинов – антител, представляющих иммунный ответ на уровне слизистого барьера желудочно – кишечного тракта. Для стимуляции синтеза Ig A нужно пероральное введение антигенов возбудителей. Созданы трансгенные растения путем введения в их геном генов микроорганизмов, ответственных за синтез микробных белков – антигенов.

Стенки клеток растений обеспечивают эффективную защиту находящегося в них микробного белка – антигена при прохождении ротовой полости, желудка. Поэтому «упакованный» таким образом антиген достигает кишечника, где при расщеплении растительной клетки кишечными соками высвобождается и индуцирует синтез секреторных Jg A.

Концепция производства вакцин в трансгенных растениях впервые была сформулирована Х. Мэйсен с соавт. (1992 г.). Они предприняли попытку получения съедобной вакцины против вируса гепатита В на основе трансгенного табака. Затем был создан трансгенный картофель, продуцирующий поверхностный антиген гепатита В-НВ_sAg. При скармливании мышам клубней такого картофеля наблюдали развитие специфического иммунного ответа против вируса гепатита В. В 1999 году были начаты эксперименты на добровольцах, и у людей, поедавших сырые клубни картофеля, также наблюдали специфический противовирусный иммунный ответ. Затем были созданы трансгенные растения, продуцирующие белки вируса Норфолка, энтеротоксигенного штамма *E. coli*, вызывающих у людей острые гастроэнтериты.

Важной особенностью съедобных вакцин является их потенциальная дешевизна, биологическая безопасность (отсутствие в растении патогенов человека и животных), простота хранения и применения. Сегодня существуют промышленные сорта растений, обогащенные одним геном (табл. 29). В будущем можно будет создавать растения, продуцирующие одновременно несколько протективных антигенов разных патогенов. Это будут мультивалентные съедобные вакцины.

Можно усилить специфический иммунный статус, вводя в растения гены, ответственные за синтез антител. Так создана трансгенная соя, вырабатывающая моноклональные противоопухолевые антитела BR 96, и используемая при лечении опухолей молочной железы, толстой кишки, яичников, легких.

Растения, устойчивые к абиотическим и биотическим факторам.

– устойчивость к насекомым- вредителям: путем введения гена дельта – эндотоксина *Bacillus thuringiensis* (Bt) в геном

**Промышленные сорта растений,
обогащенные одним геном
(С.Н. Шелкунов, 2004)**

<i>Зерновые</i>	<i>Бобовые</i>	<i>Овощи и ягоды</i>	<i>Цветы</i>	<i>Многолетние растения</i>	<i>Другие</i>
Кукуруза Пшеница Рис	Соя Подсолнух Рапс	Помидор Картофель Цветная капуста Морковь Огурец Свекла сахарная Клубника Сельдерей	Роза Хризантема Герань	Яблоня Орех Ель	Хлопок Лен Люцерна
Ячмень			Гвоздика Орхидея	Тополь Пальма	Табак

растительной клетки получают инсектицидные растения. Белок *Bt* высокотоксичен для насекомых, и безопасен для животных, человека, самого растения. *Bt* является протоксином, который протеолитически расщепляется в кишечнике личинок насекомых, образуя активный токсин. Токсин специфически связывается с рецепторами в средней кишке насекомых, что приводит к лизису клеток кишечного эпителия. Взаимодействие токсина с рецепторами слизистой кишечника насекомых строго специфично. Создан трансгенный картофель, несущий ген ингибитора протеиназы, поражающий насекомое – стеблевой точильщик; фасоль, с внесенным геном ингибитора альфа – амилазы, поражающая таких вредителей как долгоносик, зерновка.

– устойчивость к гербицидам: к триазинам путем изменения хлоропластного белка растения Д-1; к гликофосфату – сверхпродукцией в растении соответствующего фермента, расщепляющего гербицид; к далапону путем введения в растение гена, ответственного за синтез фермента дегалогеназы и др.

– устойчивость к вирусным инфекциям: трансгенный табак, устойчивый к вирусу табачной мозаики, так как содержит в своем геноме кодирующую последовательность (гены) поверхностных белков вируса; также получены сорта трансгенных

растений тыквы, риса, огурцов, томата, устойчивых к различным актуальным для растений вирусным инфекциям.

Растения с улучшенными питательными и иными качествами.

В зерне злаковых белок составляет 10-15% от общей массы, а в бобовых – 20-30%. При этом 50-60% этих белков являются запасными. Основные запасные белки у бобовых представлены солерастворимыми глобулинами, в то время как у злаковых – спирторастворимыми проламинами. В проламинах злаковых обычно отсутствует лизин, а в глобулинах бобовых снижено содержание метионина и цистина. Получены трансгенные соя и кукуруза, обогащенные аминокислотным составом (по лизину и метионину).

Создан сорт риса *Oryza sativa* с улучшенными питательными свойствами за счет включения провитамина А в состав зерна. В шлифованном рисе, являющемся основным источником пищи в ряде тропических стран с многочисленным населением, отсутствует провитамин А (бета – каротин). Это приводит к дефициту витамина А и способствует развитию различных заболеваний, особенно у детей.

Создан табак, содержащий в листьях никотина в десятки раз меньше по сравнению с исходным растением.

Хлопок с окрашенным волокном. В будущем натуральное хлопковое волокно станет крепче, не будет ни мяться, ни садиться и будет иметь различную окраску без использования химических красителей.

Цветы с необычной окраской, созданные путем введения генов, ответственных за синтез антоцианинов, соединений класса флавоноидов – наиболее распространенных пигментов растений.

Сорт помидора (Flavor Savr tomato; США, 1994) – кстати это первый ГМИ; у него улучшены вкусовые качества и продлен срок хранения. Трансген содержит ингибитор гена, ответственного за синтез фермента полигалактуроназы, чем продлевается время сохранения плотности овощи до полного его созревания. Фермент полигалактуроназа, находящийся в мякоти

помидора при хранении плода разрушает составные части клеточной стенки – наступает преждевременное созревание, размягчение, гниение.

3. Биотехнологическая продукция животного происхождения

Ферменты – протеазы (телячий реннин, панкреатические протеазы), применяемые в производстве сыров, дублении кожи, гидролизе белков и мячении мяса. Так, сычужный фермент – реннин при внесении в молоко вызывает ограниченный протеолиз казеина – это начальный этап приготовления сыра.

Экстракты и суспензии клеток. сирепар – экстракт печени крупного рогатого скота, в 1 г содержится около 10 мг цианкобаламина а также аминокислоты и другие биологические активные вещества; гепатосан – сублимационно высушенные гепатоциты из печени животных доноров; стволовые, фетальные клетки печени, поджелудочной железы, щитовидной железы и других тканей. Применяются с целью заместительной терапии при недостаточной функции соответствующих органов и тканей.

– *Интерфероны:* обладают антивирусным, иммуномодулирующим, противоопухолевым действием. Их продуцируют лейкоциты, лимфоциты, фибробласты и эпителиальные клетки животных и человека. До разработки методов генетической инженерии интерфероны получали из донорской крови – до 1 мкг неочищенного интерферона из 1 л крови, т.е. примерно одну дозу для инъекции. С внедрением методов генетической инженерии были получены модифицированные штаммы *E. coli*, дрожжей, культивируемые клетки млекопитающих, в том числе фибробласты человека.

– *Инсулин:* пептидный гормон островков Лангерганса поджелудочной железы. До недавнего времени инсулин получали из поджелудочной железы быка и свиньи. Препарат отличается от человеческого инсулина 1-3 аминокислотными заменами, т.е. имеет некоторые антигенные отличия, которые могут быть причиной аллергических реакций, особенно у детей. Кроме того,

широкомасштабное терапевтическое применение инсулина сдерживалось его высокой себестоимостью и ограниченными ресурсами для его получения.

С 1982 года производится генно – инженерный инсулин на основе модифицированной *E. coli*. В настоящее время синтезированы химическим путем генетические конструкции, кодирующие синтез полипептидов инсулина.

– *Соматостатин*: гормон роста человека, продуцируемый генетически модифицированным *E. coli*, в которую встроена плазида, несущая ген соматостатина.

– *Интерлейкины*: полипептиды, участвующие в регуляции иммунного ответа; продуцируются макрофагами, лимфоцитами, а также генетически модифицированными микроорганизмами.

– *Факторы свертывания крови*, особенно факторы VIII и IX, необходимые для терапии гемофилии, при которой кровь теряет способность к свертыванию.

– *Моноклональные антитела*: получают гибридной технологией, используют при диагностике инфекционных и соматических заболеваний, предрасположенности к диабету, ревматоидному артриту, наследственным заболеваниям и др.

Трансгенные животные: коровы, овцы, козы, свиньи, кролики, которые могут продуцировать такие ценнейшие фармацевтические вещества, как тканевой активатор плазминогена, различные моноклональные антитела, эритропоэтины, интерлейкины, антитрипсин и другие биологически активные соединения.

Однако традиционная технология создания трансгенных животных путем микроинъекции генных конструкций в pronucleus зиготы является очень трудоемким и малоэффективным, что существенно тормозит внедрение новых разработок в практику промышленного производства. Достаточно отметить, что полного развития достигает менее 1% зигот, трансдуцированных чужеродным геном; у части трансгенного потомства от неудачи могут служить трансгенные нарушения. Примером (химозин – ключевой сычужный фермент из слизистой оболоч-

ки сычуга молочных телят и ягнят; необходим в сыроделии). Была получена устойчивая экспрессия химозина в молочной железе гибридных самок (300 мг/мл), но надои молока у них снизились в 8-10 раз.

Вместе с тем получены трансгенные овцы с повышенной скоростью роста шерсти; свиньи, продуцирующие альфа – и бетаглобулины человека.

Молочную железу трансгенного крупного рогатого скота предполагают использовать как «биореактор», продуцирующий различные человеческие белки – биологически активные соединения.

Генная терапия. Наследственные заболевания человека до недавнего времени были малоизученными, применялось недостаточно эффективное, симптоматическое лечение. С развитием генно – инженерных технологий появилась возможность восполнения отсутствующих в больном организме недостающих ферментов, гормонов и иных биологических соединений (табл. 30).

Таблица 30

Некоторые заболевания, генная терапия которых проходит испытания с 1990 г.

<i>Заболевание</i>	<i>Генотерапевтический препарат</i>	<i>Клетки - мишени</i>
1	2	3
Тяжелый комбинированный иммунодефицит	Аденозиндезаминаза	Лимфоциты, клетки костно
Меланома	Фактор некроза опухоли	Инфильтрирующие опухоль аутологичные клетки опухолей Аутологичные клетки опухоли
Меланома, глиобластома, рак почки	Интерлейкин - 2	Аутологичные фибробласты
Гемофилия В	Фактор IX	Аутологичные фибробласты

1	2	3
Гиперхолестеролемиа	Рецептор липопротеинов низкой плотности	Аутологичные гепатоциты
Меланома, рак толстой и прямой кишки, рак почки	Антиген гистосовместимости HLA	Клетки опухоли
Глиобластома, СПИД, рак яичников	$V7$ и β_2 - микроглобулин Тимидинкиназа вируса простого герпеса	Клетки опухоли, Т - лимфоцит
Муковисцидоз	Трансмембранный белок, нарушения в котором приводят к муковисцидозу	Эпителий носовой полости и путей
Рак молочной железы	Фактор типа 1 множественной устойчивости к лекарственным препаратам	CD34 ⁺ - клетки крови
Меланома	Гранулоцитарный Колониестимулирующий фактор	Клетки опухоли
Артрит	Антагонист рецептора интерлейкина - 1	Аутологичные фибробласты
Боковой амиотрофический склероз	Цилиндрический нейротрофический фактор (CNTF) человека	Инкапсулированные трансдуцированные экзогенные клетки
Плоскоклеточный рак головы и шеи	p53	Клетки опухоли
Анемия Фанкони	Фактор анемии Фанкони группы C	Клетки головного мозга

Х. ТЕРМИНЫ

Адвентивные почки	– почки на растениях, возникшие из клеток и тканей, обычно их не образующих.
Андрогенез	– процесс возникновения растения или его органов из микроспоры или пыльцевого зерна через соматический эмбриогенез либо через образование каллуса.
Антигены	– белки, индуцирующие образование в иммунной системе антител, способных к специфическому взаимодействию с веществом, вызывающим образование антител.
Антисыворотка	– сыворотка иммунизированного животного или человека, содержащая антитела против чужеродных агентов.
Антитела	– белки, вырабатываемые иммунной системой, блокирующие действие чужеродных патогенных агентов, белков (антигенов).
Апикальное доминирование	– явление подавления роста верхушечных почек боковых побегов гормонами, вырабатываемыми в апикальной меристеме.
Ведущая цепь	– цепь ДНК, синтезирующаяся в 5-3-направлении.
Вектор	– самореплицирующаяся (автономная) молекула ДНК, используемая в генной инженерии для переноса генов и других последовательностей от организма-донора в организм-реципиент, а также для клонирования нуклеотидных последовательностей.
Вторичный метаболит (<i>Secondary metabolite</i>)	– Вещество не являющееся обязательным для роста или функционирования клетки, но синтезирующееся в стационарной фазе (обычно участвует в защите клеток или микроорганизмов от тех или иных воздействий).
Биобезопасность	– состояние защищенности человека, общества, цивилизации и окружающей среды от вредного, опасного для жизни и здоровья

человека воздействия токсических и аллергенных биологических веществ и соединений, содержащихся в природных или генно-инженерно-модифицированных биологических объектах и полученных из них продуктах.

Биогаз

– газ, образующийся в результате анаэробного брожения субстрата, состоит в основном из метана (до 60%), углекислого газа (35-40%) и незначительного количества других газов: сероводорода, водорода (до 2%).

Биогенез

– образование органических соединений живыми организмами.

Биодеградация
(Bioremediation)

– Разрушение загрязняющих веществ, попавших в окружающую среду с помощью живых микроорганизмов.

Биоконверсия

– получение биогаза – метана из органических отходов – навоза и других. Методом их сбраживания в специальных реакторах – метантенках.

Биомасса

– общая масса особей одного вида, группы видов или сообщества в целом на единицу поверхности или объема местообитания.

Биотехнология
классическая

– наука о методах и технологиях производства, хранения и переработки сельскохозяйственной и другой продукции с использованием обычных, нетрансгенных растений, животных и микроорганизмов в природных условиях (естественных) и искусственных условиях.

Биотехнология
новейшая

– наука о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях создания и использования генетически трансформированных (модифицированных) растений, животных, микроорганизмов и вирусов в целях интенсификации производства и получения новых видов продуктов различного назначения.

Genetic immunization генная иммунизация	– Индукция у организма иммунного ответа без введения антигена, путем включения в клетки гена, кодирующего белок-антиген.
Ex vivo gene therapy генная терапия ex vivo	– Введение гена (или генов) в изолированные клетки больного. После культивирования и трансформации клетки вводят в организм больного с помощью трансфузии, инфузии или инъекции. Эта процедура позволяет устранять генетические дефекты.
In vivo gene therapy генная терапия in vivo	– Введение гена (генов) непосредственно в ткань или орган с целью устранения генетического нарушения.
Гаплоид	– ядро, клетка, организм, характеризующиеся одинарным набором хромосом, представляющим половину полного набора, свойственного данному виду организмов (символ n).
Ген	– единичная структура генетической информации, участок хромосомы (молекулы ДНК), кодирующий структуру одной или нескольких полипептидных цепей, или молекул РНК, или определенную регуляторную функцию.
Генная инженерия	– совокупность приемов, методов и технологий, в том числе технологий получения рекомбинантных рибонуклеиновых и дезоксирибонуклеиновых кислот. По выделению генов из организма, осуществлению манипуляций с ними и введению их в другие организмы.
Генотерапия	– лечение наследственных болезней с помощью введенных в геном реципиента чужеродных генов или вживление полноценных генетических соматических клеток в ткани биологического объекта.
Генно-инженерная деятельность	– деятельность ученых, специалистов, научных организаций и государственных органов, направленная на получение, испытание, транспортировку и использование

Гетерозис	генетически модифицированных организмов (ГМО) и полученных из них продуктов. – повышение жизнеспособности гибридов первого поколения в результате скрещивания исходных родительских форм, отличающихся между собой по ряду признаков и свойств.
Гиногенез	– процесс возникновения растения из клеток зародышевого мешка.
Гбридома (<i>Hybridoma</i>)	– клеточная линия, полученная при слиянии нормальных антителообразующих клеток (лимфоцитов) и миеломных клеток. Обладает способностью к неограниченному росту и синтезу моноклональных антител.
Glycosylation гликозилирование	– ковалентное присоединение сахарного остатка к белковой молекуле.
Государственное регулирование генно-инженерной деятельности	– регулирование государственными органами в соответствии с законами и другими правовыми актами отношений между участниками генно-инженерной деятельности в сфере природопользования, охраны окружающей среды и обеспечении экологической безопасности.
Дедифференциация	– переход специализированных, неделающихся клеток к образованию недифференцированных делящихся каллусных клеток.
ДНК	– молекула дезоксирибонуклеиновой кислоты, состоящей из нуклеотидов (аденин, гуанин, цитозин, тимин), дезоксирибозы и остатков фосфорной кислоты.
Зигота	– оплодотворенная яйцеклетка.
Липкий конец	– свободный одноцепочечный конец двуцепочечной ДНК, комплементарной одноцепочечному концу, принадлежащему этой же или другой молекуле ДНК.
Lignocellulose лигноцеллюлоза	– комплекс лигнина, гемицеллюлозы и целлюлозы, составляющий структурный каркас клеточной стенки растений.
Изолированный протопласт	– растительная клетка, лишенная клеточной стенки с помощью ферментативного разрушения или механическим способом.

ИУК (<i>Indole-3-acetic acid</i>) индолил-3-уксусная кислота	– растительный гормон, относящийся к классу ауксинов, стимулирующий рост растений.
Инокулюм (<i>трансплант</i>)	– часть суспензионной (калусной) культуры, используемая для пересадки в свежую среду.
Каллус	– ткань, возникшая путем неорганизованной пролиферации клеток органов растений.
Клеточная селекция	– метод выделения генетически модифицированных мутантных клеток и соматоклональных вариаций с помощью селективных условий.
Клон	– совокупность клеток или молекул, идентичных одной родоначальной клетке или молекуле.
Клональное микроразмножение	– получение <i>in vivo</i> неполовым путем растений, генетически идентичных исходному растению.
Клонирование	– получение генетически идентичных клеток органов популяций.
Клонирование (<i>Cloning</i>)	– совокупность процедур, использующихся для получения клонов. Клонирование многоклеточных организмов, например, включает пересадку ядер соматических клеток в оплодотворенное яйцо с удаленным пронуклеусом.
Корончатый галл (<i>Crow gall</i>)	– Опухоль растений, образование которой вызывают бактерии рода <i>Agrobacterium</i> .
Кормовой концентрат лизина (ККЛ)	– промышленный кормовой препарат, обогащенный лизином (до 10%).
Кормовой концентрат триптофана (ККТ)	– промышленный кормовой препарат, обогащенный триптофаном (до 3%).
Кормовые витаминные препараты	– промышленные кормовые препараты, обогащенные витаминами.
Маркировка продуктов из ГМО	– нанесение специальных меток-обозначений (символов) на упаковке товаров и продуктов, полученных из ГМО при их реализации.

Меристема	– образовательные ткани с активно делящимся недифференцированными клетками.
Моноклональные антитела (<i>Monoclonal antibodies</i>)	– однотипные антитела, строго специфичные в отношении одного эпитопа (антигенной детерминанты). Синтезируются гибридомами – клеточными гибридами, полученными при слиянии нормальных антителообразующих клеток с миеломной опухолевой клеткой, способной к неограниченному росту.
Мутация	– спонтанное или индуцированное изменение гена, последовательности нуклеотидов хромосомы, генома, приводящее к изменению тех или иных признаков и сохранению их в поколениях.
Митоз	– процесс деления эукариотических соматических клеток.
Мутагены	– факторы, увеличивающие частоту возникновения мутаций в молекуле ДНК.
Незаменимые аминокислоты	– аминокислоты, которые не синтезируются в организме человека и животных.
Нуклеиновые кислоты	– это наиболее высокомолекулярные природные соединения (полимеры), состоящие из остатков различных нуклеотидов. Существуют два типа нуклеиновых кислот: РНК, ДНК.
Овуляция	– высвобождение созревающей яйцеклетки из фолликула яичника.
Органогенез	– процесс возникновения в неорганизованно растущей массе каллусных клеток зачатков органов (корней, листовых зачатков и побегов).
Отрицательная суперспирализация	– введение в двухцепочечную ковалентно замкнутую ДНК супервитков, направление которых противоположно направлению витков цепей молекулы.
Паргеногенез	– развитие особи с участием только материнских генов.
Плавление ДНК	– денатурация ДНК.
Плаزمид	– основа плазмидного вектора – кольцевая двухцепочечная ДНК, обладающая способ-

ностью к автономной репликации, а также к встраиванию в нее и передаче в геном реципиента чужеродных генов и других последовательностей ДНК.

Плазмида
(*Plasmid*)

– внехромосомный генетический элемент, способный к длительному автономному существованию и репликации. Обычно это двухцепочечная кольцевая ДНК длиной 1-200 т.п.н.

Праймер
(*Primer*)

– короткий олигонуклеотид, который гибридизуется с матрицей и служит затравкой при ее копировании.

Протопласт

– содержимое растительной клетки, лишенной клеточной стенки с помощью ферментативного разрушения или механическим способом.

Промотор

– участок гена, ответственный за начало его транскрипции.

Пронуклеус

– ядро (мужское, женское) оплодотворенной яйцеклетки.

Половой процесс

– слияние мужской (спермия) и женской (яйцеклетки) половой клетки, в ходе которого образуется диплоидная клетка (зигота) и определяется пол будущей особи.

Самка-реципиент

– самка, в половые пути которой вводятся яйцеклетки или эмбрионы для дальнейшего вынашивания (синонимы: приемная мать, ложнобеременная самка).

Сомаклоны

– регенеранты растений, полученные из соматических клеток и обладающие определенными отличиями от исходных форм.

**Соматическая
вариабельность**

– размах колебаний в различии признаков у растений, регенерированных из культивируемых соматических клеток.

**Соматическая
гибридизация**

– процесс вовлечения в генетическую рекомбинацию хромосомы и генов ядра и органелл вне сексуального цикла, например, путем слияния изолированных протопластов. Приводит к появлению гибридных клеточных линий и соматических гибридов растений.

Соматический гибрид	– регенерантное растение, полученное путем слияния (гибридизации) соматических клеток.
Соматический эмбриогенез	– процесс образования зародышеподобных структур (эмбриоидов) в культуре ткани и клеток.
Рекомбинантный ген	– ген, состоящий из компонентов различных генов.
Рекомбинантная ДНК	– ДНК, состоящая из участков различных исходных молекул ДНК.
Рекомбинация	– перераспределение генетического материала родителей, приводящее к наследственной комбинативной изменчивости.
РНК	– молекула рибонуклеиновой кислоты, в состав которой входят нуклеотиды (аденин, гуанин, цитозин, урацил), рибоза и остатки фосфорной кислоты.
Рестриктаза, рестрицирующая эндонуклеаза (<i>Restriction endonuclease</i>)	– бактериальный фермент, расщепляющий двухцепочечную молекулу ДНК в специфических сайтах.
Ризосфера (<i>Rhizosphere</i>)	– слой почвы, непосредственно примыкающий к корням растений и характеризующийся повышенным содержанием микроорганизмов.
Тотипотентность	– свойство соматических клеток растений полностью реализовывать свою наследственную программу онтогенетического развития при определенных условиях выращивания вплоть до образования взрослых растений и семян.
Трансгенез	– процесс переноса с помощью различных векторов донорских, чужеродных генов в клетки реципиентных растений, животных и микроорганизмов.
Трансгенные, генетически модифицированные организмы (ГМО)	– растения, животные, микроорганизмы и вирусы с измененной наследственностью, вызванной включением в их геном чужеродных генов с помощью генно-инженерных методов.

Трансляция	– синтез белка в рибосомах при участии информационной, транспортной РНК и других факторов.
Транскрипция	– образование РНК-копии на матрице ДНК с помощью фермента РНК-полимеразы.
Трансплант (<i>Инокулюм</i>)	– часть каллусной (суспензионной) культуры, используемой для пересадки на свежую питательную среду.
Фитогормоны	– природные и синтетические препараты, вызывающие различные ростовые или формативные эффекты и не обладающие действием удобрений и гербицидов.
Фолликул	– полость в яичнике, в которой происходит развитие и созревание женской половой клетки.
Фолликулостимулирующий гормон	– гормон передней доли гипофиза, вызывающий рост фолликулов яичника и секрецию эстрогенов.
Эмбриональные стволовые клетки, ES-клетки (<i>Embryonic stem cells</i>)	– клетки из эмбрионов на стадии бластоцисты, способные к дифференцировке в любые типы клеток, в том числе и в клетки зародышевой линии, при введении в другой эмбрион на стадии бластоцисты.
Эксплант	– фрагмент ткани или органа, инкубируемый на питательной среде самостоятельно или используемой для получения первичного каллуса.
Электропорация	– метод переноса генов в клетки с помощью электрического разряда, вызывающего образование дополнительных пор в клеточной мембране.
Целлюлоза (<i>Cellulose</i>)	– высокомолекулярный линейный полисахарид, состоящий из остатков L-D-глюкозы, соединенных (1,4)-связями. Участвует в образовании структурного скелета растительных клеток.
Цитокинины (<i>Cytokinins</i>)	– растительные гормоны, индуцирующие деление клеток.
Ядерное клонирование (<i>Nuclear cloning</i>)	– получение живого организма из безъядерной яйцеклетки с вживленным диплоидным соматическим ядром.

Основная литература

1. *А.М. Безбородов.* Ферментативные реакции в биотехнологии. - М.: Наука, 1994. 282 с.
2. *М.Е. Беккер, П.К. Лиепиньш, Е.П. Райпулис.* Биотехнология. М. 1990. 334 с.
3. Биотехнология (в 8-ми книгах). Учеб. пособие/под ред. Н.Е. Егорова, В.Д. Самуилова. - М., 1987.
4. Биотехнология. Под ред. А.А.Баева. - М., 1984. 309 с.
5. *Г.Ж. Валиханова.* Биотехнология растений. Алматы, 1996. 272 с.
6. *У.Э. Вистур, И.А. Шмите, А.В. Жилевич.* Биотехнология: Биологические агенты. Технология, аппаратура. Рига, 1987. 263 с.
7. *Л.И. Воробьева.* Промышленная микробиология. Учеб. пособие. - М., 1989. 294 с.
8. *Б.Глик, Дж. Пастернак.* Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. - М., 2002. 589 с.
9. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии)/ Под ред. Дьяконова Л.П., Ситькова В.И. - М., 200. 400 с.
10. *Н.В. Катаева, Р.Г. Бутенко.* Клональное микроразмножение растений. - М., 1983. 174 с.
11. *Г.И. Квеситатзе, А.М. Безбородов.* Введение в биотехнологию. М.: Наука, 2002. 284 с.
12. *В.Ф. Красота, Б.П. Завертяев.* Биотехнология в животноводстве. - М., 1994.
13. *К. Лихтенштейн, Дж. Дрейпер.* Генетическая инженерия растений. Клонирование ДНК. Методы. Под. Ред. Д. Гловера. М.: Мир, 1988. С. 315-380.
14. Микробные ферменты и биотехнология (под ред. В.М.Фогарти). - М., 1986. 318 с.
15. Промышленная микробиология. Учеб. пособие/Под ред. Н.Е. Егорова. В.Д. Самуилова. - М., 1987.
16. *А. Сассон.* Биотехнология: свершения и надежды. М., 1987. 411 с.
17. Сельскохозяйственная биотехнология: Учеб./Под ред. В.С. Швелухи. - М., 2003. 469 с.
18. *А.П. Синьшин, Е.И. Райника, В.И. Лозинский, С.Д. Спасов.* Имобилизованные клетки микроорганизмов. - М., 1994. 288 с.
19. Основы сельскохозяйственной биотехнологии/Муромцев Г.С., Бутенко Р.Г., Тихоненко Т.Н., Прокофьев М.И. - М., 1990. 384 с.
20. Экологическая биотехнология. Под ред. К.Ф. Форстера, Д.А. Дж. Вейза. - Л., 1999. 384 с.
21. Экология микроорганизмов: Учеб./Под ред. А.И. Нетрусова. - М., 2004. 272 с.
22. *С.Н. Щелкунов.* Генетическая инженерия: Учебно-справ. пособие. 2-е изд., испр. и доп. - Новосибирск: Сиб.унив. изд-во. 2004. 496 с.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I	ВВЕДЕНИЕ	3
II	ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ	5
III	ОТКРЫТИЯ И РАЗРАБОТКИ, ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ	14
	1) Биотехнология микроорганизмов	21
	2) Биотехнология растений	29
	3) Биотехнология животных организмов, клеток и тканей	34
IV	ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ - БИОПРОДУЦЕНТЫ	41
	1) Промышленные микроорганизмы и ферменты	41
	2) Культуры клеток и ткани растений	61
	3) Культуры клеток и трансгенные животные	80
V	СОХРАНЕНИЕ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ <i>in vitro</i>	85
VI	СЕЛЕКЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ - БИОПРОДУЦЕНТОВ	95
	1) Селекция промышленных микроорганизмов	95
	2) Селекция в растениеводстве	102
	3) Селекция в животноводстве	106
VII	ТЕХНОЛОГИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК	110
VIII	ТИПОВЫЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ	125
	1) Микробиологический синтез, ферментация	125
	2) Технология моноклональных антител	140
	3) Клональное микроразмножение растений	153
IX	БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ПРОДУКЦИЯ	166
	1) Биотехнологическая продукция микробного происхождения	166
	2) Биотехнологическая продукция растительного происхождения	178
	3) Биотехнологическая продукция животного происхождения	185
X	ТЕРМИНЫ	189
	Основная литература	198