

ПЕРМСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ

**И. А. Толмачева**

# **БИОТЕХНОЛОГИЯ**



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«ПЕРМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

И. А. Толмачева

# БИОТЕХНОЛОГИЯ

*Допущено методическим советом  
Пермского государственного национального  
исследовательского университета в качестве  
учебного пособия для студентов химического факультета,  
изучающих дисциплину «Биотехнология»*



Пермь 2022

УДК 663.1(075.8)

ББК 30.16я7

T524

**Толмачева И. А.**

T524 Биотехнология [Электронный ресурс] : учебное пособие / И. А. Толмачева ; Пермский государственный национальный исследовательский университет. – Электронные данные. – Пермь, 2022. – 4,26 Мб ; 177 с. – Режим доступа: <http://www.psu.ru/files/docs/science/books/uchebnie-posobiya/Tolmacheva-Biotekhnologiya.pdf>. – Заглавие с экрана.

ISBN 978-5-7944-3857-4

Учебное пособие содержит теоретический и методический материал, соответствующий программе дисциплины «Биотехнология». Предназначен для студентов старших курсов химического факультета.

**УДК 663.1(075.8)**

**ББК 30.16я7**

*Издается по решению ученого совета химического факультета  
Пермского государственного национального исследовательского университета*

*Рецензенты:* кафедра химии и биотехнологии Пермского национального исследовательского политехнического университета (зав. кафедрой, д-р техн. наук **Н. Б. Ходяшев**, доцент кафедры, канд. хим. наук **Л. Д. Аснин**);

доцент кафедры агрохимии Пермского государственного аграрно-технологического университета им. академика Д.Н. Прянишникова, канд. с.-х. наук **М. Г. Субботина**

ISBN 978-5-7944-3857-4

© ПГНИУ, 2022

© Толмачева И. А., 2022

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>РАЗДЕЛ 1. ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ...</b>	4
1.1. Понятие биотехнологии, ее задачи, подбор и культивирование биологических объектов.....	4
1.2. Типы биологических процессов. Биореакторы. Отделение, очистка и модификация продуктов.....	24
1.3. Имобилизованные ферменты и биокаталитические системы.....	46
1.4. Сырьевая база промышленной биотехнологии.....	66
1.5. Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов.....	79
<b>РАЗДЕЛ 2. ОСНОВЫ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ.....</b>	91
2.1. Методы генетического конструирования <i>in vivo</i> .....	91
2.2. Методы генетического конструирования <i>in vitro</i> .....	115
<b>РАЗДЕЛ 3. ПРИЛОЖЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ В СФЕРАХ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ.....</b>	144
3.1. Методы генной инженерии в медицине (генная терапия).....	144
3.2. Методы генной инженерии в сельском хозяйстве (трансгенные растения и животные) и пищевой промышленности (генно-модифицированные источники пищевой продукции).....	155
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	176

## РАЗДЕЛ 1. ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

### 1.1. Понятие биотехнологии, ее задачи, подбор и культивирование биологических объектов

С древних времен человечеству были известны отдельные биотехнологические процессы, используемые в различных сферах практической деятельности человека (хлебопечение, виноделие, приготовление кисломолочных продуктов и др.). С тех пор сфера приложения биотехнологии пополнилась микробиологическими методами получения ацетона, бутанола, антибиотиков, органических кислот, витаминов, кормового белка. Развитие методов для изучения структуры белков, выяснение механизмов функционирования и регуляции активности ферментов открыли путь к направленной модификации белков и привели к рождению инженерной энзимологии. На стыке технологии рекомбинантных ДНК и традиционной промышленной микробиологии в конце 70-х гг. как новая область исследований сформировалась молекулярная биотехнология, в основе которой лежит перенос единиц наследственности (генов) из одного организма в другой, осуществляемый методами генной инженерии (технология рекомбинантных ДНК).

#### ИНТЕРЕСНЫЙ ФАКТ

15 октября 1980 г. на Нью-Йоркской фондовой бирже произошло знаменательное событие: уже через 20 минут после начала торгов стоимость одной акции биотехнологической компании Genentech поднялась с 35 до 89 долларов. Это был рекордный для того времени скачок цен на акции коммерческого предприятия. К моменту закрытия торгов в тот день цена одной акции Genentech составляла 71,25 доллара, а стоимость всех 528 тыс. акций была столь баснословно высока, что мелкие инвесторы, собиравшиеся приобрести небольшой пакет акций, не имели никаких шансов. По-видимому, это был первый случай в истории, когда о начале великой технологической революции возвестил биржевой колокол. В 1980 г., когда фирма Genentech впервые предложила обществу свои акции, это была небольшая компания в Калифорнии, в течение четырех лет успешно работавшая над проблемой получения рекомбинантных ДНК. За два года до этого ученым компании удалось выделить фрагменты гена (последовательности ДНК), кодирующие человеческий инсулин, и перенести их в генетические элементы (клонированные векторы), способные реплицироваться в клетках обычной кишечной палочки (*Escherichia coli*). Эти бактериальные клетки работали как биологические фабрики по производству человеческого инсулина, который после соответствующей очистки мог использоваться как лекарственный препарат для больных диабетом, дающих аллергическую реакцию на свиной инсулин. Стратегия переноса функциональной единицы наследственности (гена) из одного организма в другой была разработана американскими учеными Стэнли Коэном и Гербертом Бойером в 1973 г. И Коэну, и Бойеру, и многим другим было ясно, что технология рекомбинантных ДНК представляет огромные возможности.

В начале 70-х гг. традиционная биотехнология как научная дисциплина была не слишком известна; исследования в этой области в основном проводились в отделах инженерной химии и иногда в рамках социальных микробиологических программ.



исследования в этой области в основном проводились в отделах инженерной химии и иногда в рамках социальных микробиологических программ. Термин «биотехнология» был придуман в 1917 г. венгерским инженером Карлом Эреки для описания процесса крупномасштабного выращивания свиней с использованием в качестве корма сахарной свеклы. По определению Эреки, биотехнология – это «все виды работ, при которых из сырьевых материалов с помощью живых организмов производятся те или иные продукты». Однако это совершенно точное определение не получило широкого распространения. Долгое время термин «биотехнология» относился к очень

разным дисциплинам. С одной стороны, его употребляли, говоря о промышленной ферментации, с другой – применительно к той области, которая сейчас называется эргономикой. Такой двойственности пришел конец в 1961 г., когда шведский микробиолог Карл Герен Хеден порекомендовал изменить название научного журнала «Journal of Microbiological and Biochemical Engineering and Technology» («Журнал микробиологической и химической инженерии и технологии»), специализировавшегося на публикации работ по прикладной микробиологии и промышленной ферментации, на «Biotechnology and Bioengineering» («Биотехнология и биоинженерия»).

С этого момента *биотехнология* оказалась четко и необратимо связана с исследованиями в области «промышленного использования биологических процессов и агентов на основе получения высокоэффективных форм микроорганизмов, культур клеток и тканей растений и животных с заданными свойствами».

Молодая технология и созданные ею генетически модифицированные организмы вызвали столько же опасений, сколько воодушевления. «Нам пришлось быть ужасно осторожными, ибо этого "джина" нельзя вернуть обратно в бутылку, – говорит Джордж Ратманн, первый директор биотехнологической компании "Амджен" (Саузенд Оукс, шт. Калифорния). – Может случиться так, что будет создан новый инфекционный агент, более смертоносный, чем оспа или стрептококк, особенно если все это будет скомбинировано в вирусном организме».

Подобные опасения заставили ученых в 1975 г. созвать конференцию в Пасифик-Гров (шт. Калифорния). На этой конференции примерно 140 ученых

разработали строгие правила, определяющие пределы, которыми должны ограничиваться исследования рекомбинантной ДНК. Например, они постановили, что данная технология может применяться только к тем организмам, которые не способны самостоятельно жить вне лабораторий, и не должна использоваться в генах, которые могут проявлять активность в организме человека.

Но были и такие компании, которые радостно встретили новую технологию. В 1976 г. Бойер вместе с венчурным инвестором Бобом Свэнсоном основали компанию Genentech в южной части Сан-Франциско. Бойер сразу осознал потенциальные возможности новой технологии. «Это была очень захватывающая, стимулирующая возможность – превратить это научное начинание, частью которого я был, в нечто значимое в плане создания медикаментов и лекарств на благо людей», – говорит Бойер.

Современная биотехнология тесно стыкуется с рядом научных дисциплин, осуществляя их практическое применение или же являясь их основным инструментом.



В качестве *первоочередных задач биотехнологии* определены создание и широкое народнохозяйственное освоение:

- новых биологически активных веществ и лекарственных препаратов для медицины (интерферонов, инсулина, гормонов роста человека, моноклональных антител и т.д.), позволяющих осуществить в здравоохранении раннюю

диагностику и лечение тяжелых заболеваний – сердечно-сосудистых, злокачественных, наследственных, инфекционных, в том числе вирусных;

- микробиологических средств защиты растений от болезней и вредителей, бактериальных удобрений и регуляторов роста растений; новых высокопродуктивных и устойчивых к неблагоприятным факторам внешней среды сортов и гибридов сельскохозяйственных растений, полученных методами генетической и клеточной инженерии;

- ценных кормовых добавок и биологически активных веществ (кормового белка, аминокислот, ферментов, витаминов, ветеринарных препаратов и др.) для повышения продуктивности животноводства; новых методов биоинженерии для эффективной профилактики, диагностики и терапии основных болезней сельскохозяйственных животных;

- новых технологий получения хозяйственно ценных продуктов для использования в пищевой, химической, микробиологической и других отраслях промышленности;

- технологий глубокой и эффективной переработки сельскохозяйственных, промышленных и бытовых отходов, использования сточных вод и газо-воздушных выбросов для получения биогаза и высококачественных удобрений.

Методы, применяемые в биотехнологии, можно подразделить на:

- ✓ Микробиологические и цитологические (*микроскопия, клеточные технологии: культивирование, гибридизация, реконструкция и др.*);

- ✓ Молекулярно-биологические (*молекулярные и генные технологии: рекомбиногенез, секвенирование, фаговый и клеточных дисплей и пр.*);

- ✓ Физико-химические (*мутагенез, инструментальные методы и пр.*).

В промышленном масштабе подобная биотехнология представляет собой уже биоиндустрию (табл. 1). Последняя включает в себя, с одной стороны, отрасли, в которых биотехнологические методы могут с успехом заменить широко используемые в настоящее время традиционные методы, а с другой – отрасли, в которых биотехнология играет ведущую роль.

**Схематическое распределение основных продуктов биотехнологии**

<b>ТЕХНОЛОГИЯ</b>	<b>Здравоохранение</b>	<b>Сельскохозяйственное производство и производство продуктов питания</b>	<b>Сельское хозяйство</b>	<b>Энергетика</b>	<b>Химическая промышленность</b>
<b>Сбраживание</b>	Антибиотики Витамины Ферменты Аминокислоты Нуклеотиды Стероиды Алкалоиды Диагностические препараты	Лимонная кислота Аминокислоты Нуклеотиды Ферменты Биополимеры	<b>Биопестициды</b>	Этанол Ацетонобути- ноловая смесь Биогаз	Химия этанола Этилен Уксусный альдегид Ацетон Бутанол Бутадиен
<b>Энзиматическая инженерия</b>		Фруктозо-глюкозный сироп Глюкозный сироп		Этанол	
<b>Техника рекомбинантных ДНК (генетическая инженерия)</b>	Интерфероны Гормоны Вакцины				
<b>Культуры клеток</b>	Интерфероны Вакцины Компоненты крови Моноклональные антитела	Белок одноклеточных (кормовой белок)	<b>Клоны</b>		

## **Подготовка биологических объектов**

### ***Подбор объектов***

Главным звеном биотехнологического процесса, определяющим его сущность, является *клетка*. Именно в ней синтезируется целевой продукт. По образному выражению Ю.А. Овчинникова (1985), клетка представляет собой миниатюрный химический завод, работающий с колоссальной производительностью, с предельной согласованностью и по заданной программе. Основа современного биотехнологического производства – микробиологический синтез, т.е. синтез различных веществ с помощью микроорганизмов.

Независимо от природы объекта, **начальным этапом** биотехнологической разработки является получение чистых культур клеток и тканей.

Культура ткани (*tissue culture*) – метод сохранения жизнеспособности тканей, или целых органов (культура органа), или отдельных клеток (культура клеток) вне организма *in vitro* с созданием условий, обеспечивающих питание, газообмен и удаление продуктов метаболизма, а также асептических условий, достигаемых, в частности, путем добавления антибиотиков. Впервые культура ткани (клетки зачатка нервной системы зародыша лягушки в капле лимфы) получена Р. Гаррисоном в 1907 г.

В настоящее время известно более 100 тыс. различных видов микроорганизмов. Многих еще предстоит выявить. Как провести правильный подбор именно тех форм, продукция которых нас интересует, при столь большом разнообразии микроорганизмов? Для решения подобных задач проводится выделение микроорганизмов. Отбираются пробы из мест, где обитание того или иного продуцента наиболее вероятно (углеводородокисляющие микроорганизмы – почва возле бензоколонок, винные дрожжи – виноградник, анаэробные целлюлозоразлагающие и метанобразующие – рубец жвачных животных и т.д.). Образцы проб вносят в жидкие питательные среды специального состава.

### **Питательные среды**

Питательные среды являются основой бактериологических исследований. Они служат для выделения из исследуемого материала чистых культур микробов, для изучения их свойств. На питательных средах создаются оптимальные условия для размножения микроорганизмов. В состав сред должны входить вещества, необходимые для построения всех компонентов цитоплазмы, т.е. все источники роста живого организма. Сюда, в первую очередь, относятся источники азота, углерода, водорода и кислорода.

*Источник водорода и кислорода* в питательных средах – вода. Источником азота служат органические соединения, которые получают из мяса, рыбы, плаценты, молока, яиц, крови. В результате гидролиза панкреатином или трипсином из этих продуктов получают т.н. гидролизаты, содержащие большое

количество аминокислот и пептонов, которые хорошо усваиваются большинством микроорганизмов. Нативный белок усваивают только некоторые микроорганизмы, имеющие экзопротеазы. Гидролизаты являются основой для приготовления сред для многих микроорганизмов.

*Источником углерода* для патогенных микробов являются, главным образом, различные углеводы: моно- и дисахара, многоатомные спирты, органические кислоты и их соли.

Кроме органоенов, бактериям необходимы неорганические соединения, содержащие фосфор, калий, серу, натрий, магний, железо, а также микроэлементы: кобальт, йод, марганец, бор, цинк, молибден, медь и др.

Потребность микроорганизмов в неорганических соединениях удовлетворяется прибавлением к питательной среде солей  $\text{KН}_2\text{PO}_4$   $\text{K}_2\text{HPO}_4$  и др. Микроэлементы, выполняющие роль катализаторов химических процессов, необходимы в ничтожно малых количествах и поступают в питательную среду с пептоном, неорганическими солями и водой. Наряду с перечисленными органическими элементами, многие микроорганизмы нуждаются в факторах роста, т.е. в веществах, которые они сами не могут синтезировать. Факторы роста необходимо добавлять в питательные среды в готовом виде. К факторам роста относятся различные витамины, источником которых в питательных средах являются прибавленные к питательной среде продукты растительного и животного происхождения, содержащие в своем составе никотиновую, пантотеновую, парабензойную кислоты, витамины А, В, С и др.

Питательные вещества микробами могут усваиваться только при определенной реакции среды, т.к. проницаемость оболочек микробных клеток изменяется в зависимости от рН среды.

### **Требования, предъявляемые к питательным средам**

1. Питательные среды должны содержать необходимые для питания микробов питательные вещества.
2. Иметь реакцию рН, оптимальную для выращиваемого вида микроба.
3. Питательные среды должны иметь достаточную влажность и вязкость, т.к. микробы питаются по законам диффузии и осмоса.
4. Обладать изотоничностью и иметь определенный окислительно-восстановительный потенциал ( $\text{rH}_2$ ).
5. Питательные среды должны быть стерильными, обеспечивая тем самым возможность выращивания чистых культур.

Потребность в питательных веществах и физических условиях у различных видов микробов неодинакова, и этим исключается возможность создания универсальной питательной среды.

По консистенции различают *плотные* и *жидкие* питательные среды. Плотные готовят на основе жидких посредством прибавления к ним клеевых веществ: агар-агара или желатина! Агар-агар (по-малайски – желе) – продукт растительного происхождения, добывается из морских водорослей. В воде агар-агар растворяется при температуре 80–86°C, затвердевает при 36–40°C и поэтому используется при уплотнении питательных сред для выращивания разных групп микроорганизмов при оптимальной для них температуре.

### **Классификация питательных сред**

Производится по их составу и назначению.

*По составу:*

1. Различают группу сред общего назначения – *простых*. К этой группе относят мясопептонный бульон (простой питательный бульон), мясопептонный агар (простой питательный агар), питательный желатин. Эти среды применяются для выращивания многих патогенных микробов. Среда общего назначения, или простые питательные среды, готовятся обычно из гидролизатов с добавлением пептона и хлористого натрия. Их используют также как основу для приготовления сложных сред.

2. К *сложным* средам относятся среды селективные, специальные и дифференциально-диагностические.

*По назначению:*

**Среды селективные** (селективные, избирательные, накопления, обогащения). Принцип создания селективных питательных сред базируется на удовлетворении основных биохимических и энергетических потребностей того вида микроба, для культивирования которого они предназначены, или на добавление ингибиторов, подавляющих рост сопутствующей микрофлоры. Определенный состав и концентрация питательных веществ, микроэлементов, ростовых факторов при строго определенном значении рН или добавлении ингибиторов обеспечивают оптимальные условия для выращивания одного или нескольких видов микроорганизмов. При посеве на них материала, содержащего смесь различных микробов, раньше всего будет проявляться рост того вида, для которого среда будет селективной. Примером селективных сред являются желточный бульон, селенитовый бульон, среда Плоскирева – для выращивания микробов семейства кишечных, щелочная пептонная вода – для холерного вибриона.

**Желточный бульон.** К МПБ добавляют 10–20 % бычьей желчи. Желчь подавляет рост коков и воздушной флоры, но благоприятна для размножения сальмонелл.

**Селенитовый бульон.** Состоит из фосфатного бульона с добавлением натриевой соли селенита, которая является ингибитором роста кокковой флоры, кишечной палочки, но не задерживает роста сальмонелл.

*Среда Плоскирева.* Плотная среда, содержащая ингибиторы кишечной палочки, коков, но благоприятная для роста шигелл и сальмонелл, размножение которых не тормозится бриллиантовым зелёным и желчными солями.

*Пептонная вода.* Содержит 1 % пептона и 0,5 % хлористого натрия. Среда является селективной для хлорных вибрионов, т.к. они лучше других бактерий размножаются на «голодных средах», особенно при щелочной реакции, потому что сами выделяют кислые продукты жизнедеятельности.

*Специальные среды.* Необходимы для культивирования бактерий, не растущих на простых питательных средах. Для некоторых организмов к простым питательным средам необходимо добавлять углеводы, кровь и др. дополнительные питательные вещества. Примерами простых питательных сред являются сахарный бульон и сахарный агар для стрептококка (готовится соответственно из МПБ и МПА, к которым добавляется 0,5–2 % глюкозы).

Для пневмококков и менингококков специальной средой являются сывороточный бульон и сывороточный агар (для приготовления сывороточного бульона смешивают 1 часть МПБ с 2 частями свежей сыворотки, для получения сывороточного агара к расплавленному МПА добавляется 10–25 % стерильной лошадиной или бычьей сыворотки).

*Дифференциально-диагностические среды* используют для определения видовой принадлежности исследуемого микроба, основываясь на особенностях его обмена веществ. По своему назначению дифференциально-диагностические среды разделяют следующим образом:

1. Среда для выявления протеолитической способности микробов, содержащие в своем составе молоко, желатин, кровь и т.д.

2. Среда с углеводами и многоатомными спиртами для обнаружения различных сахаролитических ферментов.

В состав дифференциально-диагностических сред, предназначенных для выявления сахаролитических свойств и окислительно-восстановительных ферментов, вводят индикаторы: нейтральную красную, кислый фуксин, бромтимоловый синий, водный голубой с розовой кислотой (ВР). Изменяя свою окраску при различных значениях pH, индикатор указывает на наличие фермента и расщепление введённого в среду ингредиента.

Сначала получают *накопительные культуры* микроорганизмов. С применением *селективных сред*.

Следующий этап – выделение *чистых культур*. Для этого используют плотные питательные среды, на которые засевают образцы проб из накопительных культур. Отдельные клетки микроорганизмов на плотных питательных средах образуют изолированные колонии, при их последующем пересеве получают чистые культуры продуцента, состоящие из популяций клеток одного

вида. Существует и другой путь подбора микроорганизмов – из имеющихся коллекций микроорганизмов.

**Главный критерий** при отборе продуцентов – способность синтезировать целевой продукт. Однако микробиологическая промышленность предъявляет к продуцентам ряд других требований, важных с точки зрения технологии производства. Микроорганизмы должны:

- 1) обладать высокой скоростью роста;
- 2) использовать для жизнедеятельности дешевые непищевые субстраты;
- 3) быть устойчивыми к заражению посторонней микрофлорой;

Все это позволяет значительно снизить затраты на производство целевого продукта.

Одноклеточные организмы, как правило, характеризуются более высокими скоростями синтетических процессов, чем высшие организмы. Так, корова массой 500 кг в течение одних суток синтезирует около 0,5 кг белка, такое же количество белка за одни сутки можно получить с помощью 5 г дрожжей. Столь высокие скорости роста характерны, однако, не для всех микроорганизмов. Существуют так называемые *олиготрофные* микроорганизмы, растущие крайне медленно. Особый интерес как объекты биотехнологических разработок представляют *фотосинтезирующие* микроорганизмы. Они используют в своей жизнедеятельности энергию света, синтезируют разнообразные вещества клеток в результате восстановления углекислоты, сопряженного с окислением воды (цианобактерии и эукариоты), способны к усвоению атмосферного азота (прокариоты), т.е. обходятся самыми дешевыми источниками энергии, углерода, восстановительных эквивалентов и азота. Выгодным объектом для биотехнологии являются *термофильные* микроорганизмы. Они оптимально растут при высоких температурах (60–80°C, отдельные представители до 110°C и выше, в подводных выбросах сверхгорячих вод на больших океанических глубинах найдены микроорганизмы, способные развиваться под давлением при температурах до 300°C), что затрудняет развитие посторонней микрофлоры. Среди термофилов обнаружены ценные продуценты спиртов, аминокислот, ферментов, молекулярного водорода. Их применение позволяет снизить затраты на стерилизацию промышленного оборудования, а скорость роста и метаболическая активность в 1,5–2 раза выше, чем у мезофилов (температурный оптимум составляет 20–45°C).

## СЕЛЕКЦИЯ

**Селекция** – направленный отбор *мутантов*, т.е. организмов, наследственность которых претерпела скачкообразное изменение вследствие структурной модификации в нуклеотидной последовательности ДНК. Генеральный путь селекции – это путь от слепого отбора продуцентов к сознательному конструированию их геномов.

Речь, по существу, идет о ступенчатом отборе: на каждом этапе из популяции микроорганизмов отбираются наиболее эффективные клоны. Ограниченность метода селекции, основанного на спонтанных мутациях, связана с их низкой частотой, что значительно затрудняет интенсификацию процесса. Изменения в структуре ДНК происходят редко. Ген должен удвоиться в среднем  $10^6$ – $10^8$  раз, чтобы возникла мутация.

К значительному ускорению селекции ведет **индуцированный мутагенез** – резкое увеличение частоты мутаций биообъекта при искусственном повреждении генома. Мутагенным действием обладают ультрафиолетовое, рентгеновское или  $\gamma$ -излучение, некоторые химические соединения, вызывающие изменения первичной структуры ДНК. К числу наиболее зарекомендовавших себя мутагенов относятся азотистая кислота, алкилирующие агенты (этилметансульфонат, *N*-метил-*N*-нитро-*N*-нитрозогуанидин и другие нитрозамины), акридиновые красители, бромурацил и т.д.

Проводят тотальную проверку (*скрининг*) полученных клонов. Отобрав наиболее продуктивные клоны, повторяют обработку тем же или другим мутагеном, вновь отбирают наиболее продуктивный вариант и т.д., т.е. и здесь речь идет о ступенчатом отборе по интересующему признаку. Трудоемкость – основной недостаток метода индуцированного мутагенеза и последующего ступенчатого отбора. Недостатком метода является также отсутствие сведений о характере мутаций. Исследователь проводит отбор по конечному результату.

Достижения молекулярной генетики позволили ввести в практику целенаправленные методы отбора продуцентов – *по их устойчивости к структурным аналогам целевого продукта*. Метод основан на регуляции ферментов по принципу обратной связи конечным продуктом биосинтетического пути. Так, при наличии глюкозы и  $\text{NH}_4^+$  клетки многих бактерий синтезируют все необходимые для жизнедеятельности азотсодержащие соединения. Если в среду добавить ту или иную аминокислоту, то ее синтез быстро прекращается. Такой же эффект вызывают структурные аналоги метаболита, которые, однако, не могут заменить метаболит. Например, аналог аминокислоты не может войти в состав белка, поэтому в присутствии аналога рост нормальных клеток подавляется в связи с голоданием по целевому продукту. В этих условиях выживают лишь некоторые клетки. Это мутанты с нарушенной регуляцией активности и синтеза

ферментов. Мутации подобного типа ведут к появлению сверхпродуцентов, синтезирующих целевой метаболит в аномально высоких концентрациях.

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Современную биотехнологию нередко характеризуют как биотехнологию на основе генетической инженерии. Действительно, это основной путь, используемый для направленной модификации биообъектов в результате введения искусственно созданных генетических программ. Иногда различают уровни генетической инженерии: 1) **генную** – прямое манипулирование рекомбинантными ДНК, включающими отдельные гены; 2) **хромосомную** – манипуляции с большими группами генов или целыми хромосомами; 3) **геномную** – перенос всего или большей части генетического материала от одной клетки к другой.

Работы в области генетической инженерии включают четыре основных этапа:

- 1) получение нужного гена;
- 2) его встраивание в генетический элемент (вектор), способный к репликации;
- 3) введение гена, входящего в состав вектора, в организм-реципиент;
- 4) идентификация (скрининг и селекция) клеток, которые приобрели желаемый ген (гены).

**1) Получение генов.** Получить нужный ген можно:

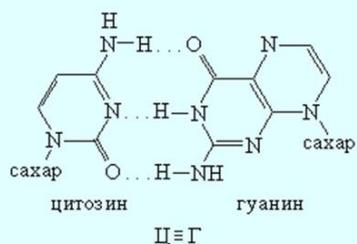
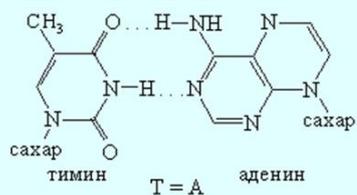
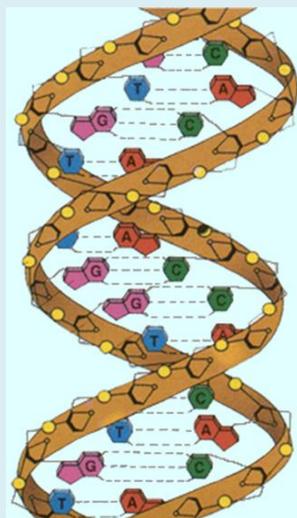
**а) выделением его из ДНК.**

Изолированную ДНК подвергают фрагментации. Для этого используют рестрикционные эндонуклеазы (*рестриктазы*), катализирующие расщепление ДНК на участках, имеющих определенные последовательности нуклеотидов (обычно 4–7 нуклеотидных пар).

### ДОПОЛНЕНИЕ. СТРУКТУРА ДНК

У высших организмов генетическая информация, как мы уже знаем, содержится в хромосомах. Последние располагаются в клеточном ядре, которое отделено оболочкой от остального клеточного содержимого (цитоплазмы). В ядерной оболочке есть специальные поры, через которые вещества проникают из ядра в цитоплазму, где и используется хранящаяся в хромосомах генетическая информация. У бактерий генетический материал не отделен от остальной клетки. У них просто нет ядра. Как мы увидим ниже, это приводит к некоторым особенностям в механизмах использования генетической информации. Подобные бактериям безъядерные организмы называются прокариотами, остальные – у которых генетическая информация хранится в клеточном ядре – эукариотами. Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) – это очень длинная молекула-макромолекула, образованная последовательным соединением фосфатных групп и молекул сахара, дезоксирибозы. К каждой молекуле дезоксирибозы

присоединено азотистое основание. В ДНК встречается всего четыре вида оснований: два пуриновых (аденин – А, гуанин – G) и два пиримидиновых (тимин – Т, цитозин – С). Соединение фосфат-сахар-основание называется нуклеотидом. Поскольку в структуре



макромолекулы ДНК сахарофосфатный остов уложен однообразно, вся генетическая информация может определяться только последовательностью оснований в цепи. Она, следовательно, записана простым четырехбуквенным алфавитом: А, Т, G и С. Однако молекула ДНК образована не одной цепью, а двумя, закрученными одна вокруг другой в двойную спираль. Хотя внутри каждой из цепей нуклеотиды соединены прочными химическими связями (ковалентными), ассоциация двух цепей в единую спираль происходит за счет слабых водородных связей, которые легко разрываются уже при обычных для большинства живых организмов температурах. Эти слабые связи соединяют азотистые основания попарно, но только в следующих комбинациях: А с Т, G с С. Модель двойной спирали для молекулы ДНК была предложена в 1953 г. Дж. Уотсоном и Ф. Криком на основе данных рентгеноструктурного анализа, полученных Р. Франклин и М. Уилкинсом. Модель позволяет понять, как же воспроизводится информация, записанная в каждой из цепей: фермент (ДНК-полимераза) раскрывает нуклеотидные пары, разделяет нити двойной спирали и затем присоединяет нуклеотиды к новой цепи, растущей вдоль каждой из старых. Присоединение происходит по правилу комплементарности: перед А фермент включает Т, перед Т – А, перед G – С, перед С – G. Исходные цепи двойной спирали, таким образом, копируются, давая начало двум идентичным двойным спиральям. Каждая из них предназначена одной из дочерних клеток, образующихся при делении. Именно так информация, хранящаяся в геноме, передается из одной клетки в другую в ходе последовательных циклов деления.

ую спираль происходит за счет слабых водородных связей, которые легко разрываются уже при обычных для большинства живых организмов температурах. Эти слабые связи соединяют азотистые основания попарно, но только в следующих комбинациях: А с Т, G с С. Модель двойной спирали для молекулы ДНК была предложена в 1953 г. Дж. Уотсоном и Ф. Криком на основе данных рентгеноструктурного анализа, полученных Р. Франклин и М. Уилкинсом. Модель позволяет понять, как же воспроизводится информация, записанная в каждой из цепей: фермент (ДНК-полимераза) раскрывает нуклеотидные пары, разделяет нити двойной спирали и затем присоединяет нуклеотиды к новой цепи, растущей вдоль каждой из старых. Присоединение происходит по правилу комплементарности: перед А фермент включает Т, перед Т – А, перед G – С, перед С – G. Исходные цепи двойной спирали, таким образом, копируются, давая начало двум идентичным двойным спиральям. Каждая из них предназначена одной из дочерних клеток, образующихся при делении. Именно так информация, хранящаяся в геноме, передается из одной клетки в другую в ходе последовательных циклов деления.

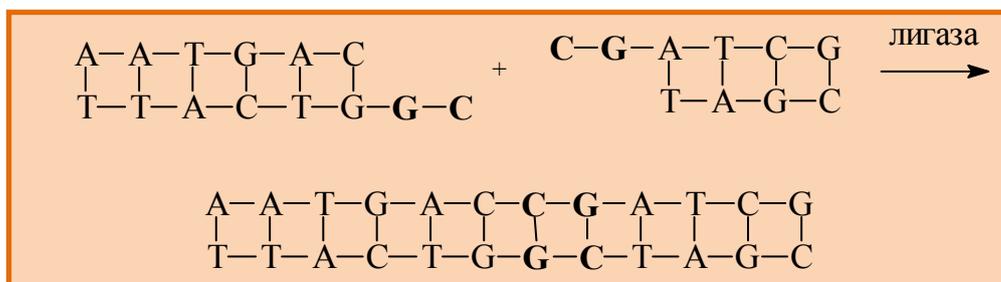
**б) Химико-ферментативный синтез генов.** Этот метод – важная альтернатива «вырезанию» генов с помощью рестриктаз из нативной ДНК. Метод включает химический синтез коротких (8–16-звенных) одноцепочечных фрагментов ДНК (олигонуклеотидов) за счет поэтапного образования эфирных связей между нуклеотидами и сшивку олигонуклеотидов между собой посредством ДНК-лигазы с образованием двуцепочечных полинуклеотидов. Химико-ферментативный синтез позволяет точно воссоздать минимально необходимую последовательность нуклеотидов и избежать проблем, связанных с элиминированием лишних нуклеотидных последовательностей во фрагментах ДНК, в том числе интронов. Методом химико-ферментативного синтеза получены гены соматостатина, А и В-цепей инсулина, проинсулина, *lac*-оператор *E. coli* и др.

в) **Ферментативный синтез генов на основе выделенной из клетки матричной РНК (мРНК).** Это наиболее популярный метод синтеза генов. Обратная транскриптаза (ревертаза) катализирует синтез нити ДНК, комплементарной мРНК. Полученную одноцепочечную ДНК, называемую комплементарной ДНК или кДНК, используют в качестве матрицы для синтеза второй нити ДНК с применением ДНК-полимеразы или ревертазы. Преимущество рассматриваемого метода состоит в том, что ген получается без интронов и других не транскрибируемых последовательностей. Помимо этого, легче создать условия, когда клетка аккумулирует нужный вид мРНК, чем отбирать ген из смеси фрагментов ДНК. Большим успехом в применении метода является получение в 1979 г. гена гормона роста человека (соматотропина).

## 2) Введение гена в вектор

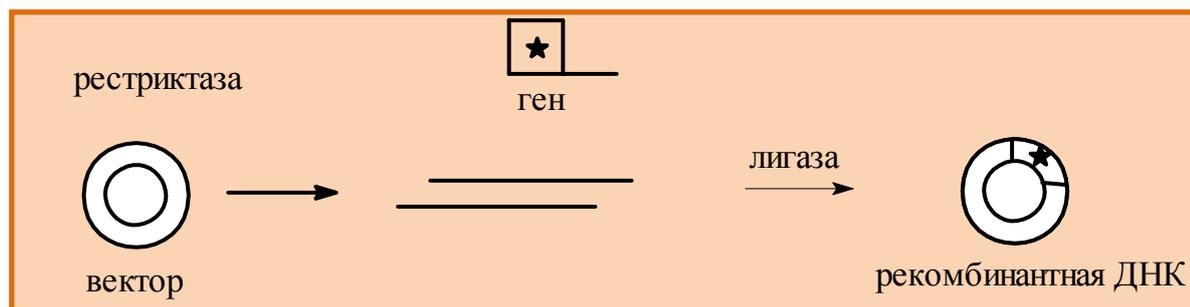
Ген, полученный тем или иным способом, содержит информацию о структуре белка, но сам по себе не может реализовать эту информацию. Нужны дополнительные механизмы, управляющие действием гена, поэтому перенос генетической информации в клетку осуществляется в составе векторов. **Векторы** – это, как правило, кольцевые молекулы, способные к самостоятельной репликации. Ген вместе с вектором образует рекомбинантную ДНК.

Конструирование рекомбинантных ДНК осуществляется *in vitro*. Кольцевая молекула вектора размыкается рестриктазой. Расщепление может происходить по середине узнаваемого участка нуклеотидных пар, и тогда обе нити ДНК «разрезаются» на одном уровне. Образующиеся фрагменты имеют двунитевые (тупые) концы. Другие рестриктазы расщепляют нити ДНК со сдвигом, так что образуется ступенька – одна из нитей ДНК выступает на несколько нуклеотидов. Образуются однострунные (липкие) концы. Если встречаются два липких фрагмента ДНК, полученные действием одной и той же рестриктазы, то в силу комплементарности концевых последовательностей они легко вступают во взаимодействие:



Необходимо, чтобы полученная линейная молекула ДНК содержала липкие концы, комплементарные вводимой ДНК. Комплементарные липкие концы вектора и вводимого гена сшивают ДНК-лигазой и полученную рекомбинант-

ную ДНК с помощью той же ДНК-лигазы вновь замыкают с образованием единой кольцевой молекулы.



Различают два основных класса векторов: вирусы и плазмиды – автономные самореплицирующиеся генетические единицы, найденные у бактерий, грибов, растений и животных.

### 3) Перенос генов в клетки организма-реципиента

Передача генов, встроенных в плазмиду, осуществляется путем трансформации или конъюгации. Если гены встраиваются в геном вируса, наиболее распространенным способом передачи информации служит трансформация.

**Трансформация** – это перенос свободной ДНК, в том числе и плазмидной, в реципиентную клетку, вызывающий изменение признаков клетки. При этом происходят рекомбинация и интегрирование однонитевого фрагмента ДНК в хромосому реципиента или какую-либо внехромосомную генетическую единицу.

Путем **конъюгации** происходит перенос лишь некоторых плазмид (конъюгативных). В этом случае информация переключивается из одной клетки бактерии (мужской, донорной) в другую клетку (женскую, реципиентную) по половым ворсинкам, представляющим собой белковые трубочки.

Под **трансдукцией** понимают передачу всего набора генов вируса или фага, приводящую к развитию вирусных частиц в клетке.

### 4) Идентификация клеток-реципиентов, которые приобрели желаемый ген (гены)

Отбор клеток проводят в две стадии. *Первая стадия* – отбор клеток, несущих соответствующий вектор (послуживший для трансплантации гена). Чаще всего такой отбор проводится по генетическим маркерам, которыми помечен вектор. *Вторая стадия* – поиск клеток, несущих не только вектор, но и ген-мишень. Для этого используют две группы методов.

## ***1. Методы, основанные на непосредственном анализе ДНК клеток-реципиентов:***

а) определение нуклеотидной последовательности ДНК. Из клеток, предположительно содержащих искомый ген, выделяют ДНК вектора, в которой проводится поиск участков, несущих этот ген; затем проводят секвенирование (как правило, части) нуклеотидной последовательности гена;

б) гибридизация выделенной из клеток ДНК с зондом, который может быть или интересующим нас геном, или соответствующей ему мРНК. Предварительно изолированную ДНК переводят в одноцепочечное состояние и вводят ее во взаимодействие с одноцепочечным ДНК- (или РНК-) зондом. Далее определяют присутствие двуцепочечных гибридных молекул ДНК.

## ***2. Методы, основанные на идентификации признака, кодируемого геном:***

а) непосредственный отбор клеток, синтезирующих белок – продукт транскрипции и трансляции гена-мишени, или клеток, образующих соединение, в синтезе которого участвуют ферменты, кодируемые геном. Так отбирали дрожжи, синтезирующие гистидин, из популяции клеток, трансформированных смесью химерных плазмид;

б) использование селективных сред, поддерживающих рост только тех клеток, которые получили ген-мишень; например, клетки-реципиенты, несущие ген-галактозидазы (фермент, необходимый для утилизации лактозы), могут быть отобраны путем выращивания бактериальных клеток на среде с лактозой в качестве единственного источника углерода;

в) иммунологическая детекция: применяется, если искомый ген в составе рекомбинантной ДНК транскрибируется и транслируется, но никак не влияет на фенотип организма; например, если ген кодирует  $\alpha$ -интерферон человека, бактериальные клетки лизируют, а затем проводят реакцию связывания антигена с антителами к  $\alpha$ -интерферону.

Иммунологический анализ основан на способности антитела узнавать специфический компонент в биологическом образце.

## КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Основой клеточной инженерии является гибридизация соматических клеток – слияние неполовых клеток с образованием единого целого. Слияние клеток может быть полным или же клетка-реципиент может приобрести отдельные части клетки-донора: цитоплазму, митохондрии, хлоропласты, ядерный геном или его крупные блоки. Введение небольших блоков генетической информации обычно осуществляется средствами генетической инженерии. Соматическая гибридизация имеет более широкие возможности для скрещивания филогенетически отдаленных организмов, чем половое скрещивание, при котором Природа допускает лишь строго определенные сочетания родительских форм.

**Этапы получения гибридных клеток.** Слиянию клеток предшествует установление тесного контакта между плазматическими мембранами. Этому препятствует наличие поверхностного заряда на природных мембранах, обусловленного отрицательно заряженными группами белков и липидов. Деполяризация мембран переменным электрическим или магнитным полем, нейтрализация отрицательного заряда мембран с помощью катионов способствует слиянию клеток. На практике широко используются ионы  $Ca^{2+}$ , хлорпромазинон. Эффективным «сливающим» (фузогенным) агентом служит полиэтиленгликоль.

Растительные, грибные и бактериальные клетки перед слиянием освобождают от клеточной стенки, при этом получают протопласты. Для скрининга полученных гибридных клеток используют различные подходы:

- 1) учет фенотипичных признаков;
- 2) создание селективных условий, в которых выживают лишь гибриды, объединившие геномы родительских клеток.

### ***Возможности метода слияния клеток***

1. Возможность скрещивания филогенетически отдаленных форм живого. Путем слияния клеток растений получены плодовые, фенотипически нормальные межвидовые гибриды табака, картофеля, капусты с турнепсом (эквивалентные природному рапсу), петунии.

2. Получение асимметричных гибридов, несущих полный набор генов одного из родителей и частичный набор другого родителя. Такие гибриды часто возникают при слиянии клеток организмов, филогенетически удаленных друг от друга. В этом случае вследствие неправильных делений клеток, обусловленных некоординированным поведением двух разнородных наборов хромосом, в ряду поколений теряются частично или полностью хромосомы одного из родителей.

3. Получение гибридов путем слияния трех и более родительских клеток. Из таких гибридных клеток могут быть выращены растения (грибы) регенеранты.

4. Гибридизация клеток, несущих разные программы развития, – слияние клеток различных органов или тканей, слияние нормальных клеток с клетками, чья программа развития изменена в результате злокачественного перерождения. В этом случае получают так называемые гибридные клетки, или гибридомы, наследующие от нормальной родительской клетки способность к синтезу того или иного полезного соединения, а от злокачественной – способность к быстрому и неограниченному росту. Основная цель – «обессмертить» клетку, продуцирующую ценные вещества путем слияния с раковой клеткой и клонирования полученной гибридной клеточной линии. Многообразны применения гибридной технологии к животным клеткам, где с ее помощью планируется получение неограниченно размножающихся продуцентов гормонов и белковых факторов крови. Наибольшее практическое значение имеют гибридомы – продукты слияния клеток злокачественных опухолей иммунной системы (миелом) с нормальными клетками той же системы – лимфоцитами.

При попадании в организм животного или человека чужеродного агента – бактерий, вирусов, «чужих» клеток или просто сложных органических соединений – лимфоциты мобилизуются для обезвреживания введенного агента. Имеется несколько популяций лимфоцитов, функции которых различаются. Существуют так называемые Т-лимфоциты, среди которых выделяются Т-киллеры («убийцы»), непосредственно атакующие чужеродный агент с целью его инактивации, и В-лимфоциты, основная функция которых состоит в продукции иммунных белков (иммуноглобулинов), обезвреживающих чужеродный агент путем связывания с его поверхностными участками (антигенными детерминантами), иными словами, В-лимфоциты вырабатывают Иммунные белки, представляющие собой антитела к чужеродному агенту – антигену.

Слияние Т-лимфоцита-киллера с опухолевой клеткой дает клон неограниченно размножающихся клеток, выслеживающих определенный антиген – тот, к которому был специфичен взятый Т-лимфоцит. Подобные Т-киллерные гибридные клоны пытаются использовать для борьбы с раковыми клетками непосредственно в организме больного.

При слиянии В-лимфоцита с миеломной клеткой получают В-гибридные клоны, широко применяемые как продуценты антител, нацеленных на тот же антиген, что и антитела, синтезируемые породившим клон В-лимфоцитом, т.е. **моноклональных антител**. Моноклональные антитела однородны по своим свойствам, они обладают одинаковым сродством к антигену и связываются с одной единственной антигенной детерминантой. В этом состоит важное преимущество моноклональных антител – продуктов В-гибридом, по

сравнению с антителами, получаемыми без применения клеточной инженерии, путем иммунизации лабораторного животного избранным антигеном с последующим выделением антител из сыворотки его крови или в результате непосредственного антигена с популяцией лимфоцитов в культуре ткани.

### **Методы хранения штаммов-продуцентов**

Поддержание биообъекта в рабочем состоянии, сохранение его ценных свойств является важной биотехнологической проблемой. Проблема сохранения ценных штаммов-продуцентов приобретает первоочередное значение в двух ситуациях: при их длительном хранении и при переносе этих штаммов из лабораторных культиваторов в промышленные биореакторы (масштабный переход или масштабирование). Длительное хранение клеток без утраты ценных свойств возможно, если резко затормозить все протекающие в них жизненные процессы, в том числе и генетические перестройки. При этом культура переводится в состояние, близкое к обратимой остановке жизни – анабиозу, и существующие методы хранения различаются по степени приближения к этому состоянию.

1. Лиофильное высушивание клеток (обезвоживание под вакуумом после замораживания при температуре  $-40 \div -60^{\circ}\text{C}$  и ниже). Этот метод хорошо зарекомендовал себя, например, в отношении продуцентов антибиотиков, сохраняющих активность в течение многих лет.

2. Высушивание на воздухе в стерильной почве, песке, на активированном угле, на семенах некоторых растений, на дисках агар-агара, на бумаге, шерстяных нитках и других носителях. Этот метод сравнительно прост в обращении, но он в недостаточной степени задерживает происходящие в популяции нежелательные генетические изменения. В последние годы применяют высушивание под вакуумом из жидкого состояния (L-высушивание). Некоторые виды микроорганизмов, в том числе плохо переносящие лиофилизацию, сохраняются после такой обработки в жизнеспособном состоянии. Большинство биообъектов, однако, не переносят L-высушивания и погибает.

3. Сохранение спор (метод пригоден для спорообразующих бактерий).

4. Криоконсервация – глубокое замораживание клеток с их последующим хранением в жидком азоте ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) или его парах ( $-150^{\circ}\text{C}$ ). Таким путем можно сохранять в течение неопределенно долгого времени объекты, не выдерживающие другие методы хранения. Создаются коллекции ценных организмов в глубоко замороженном состоянии – криобанки. Криоконсервация практически полностью (если исключить влияние космической ионизирующей радиации) предотвращает «порчу» генного фонда популяций клеток, реализуя наиболее полно состояние анабиоза.

## 5. Комбинированные способы хранения.

Для сохранения ценных свойств биообъектов при масштабировании проводится комплекс мероприятий.

- Создание щадящих условий в биореакторе, максимально приближенных к условиям в лабораторном культиваторе.
- Применение антимуtagens – веществ, снижающих частоту спонтанных мутаций.
- Использование продуцентов с так называемыми многократно вырожденными мутациями. Речь идет об организмах, несущих в геноме одновременно несколько независимых мутаций, каждая из которых сама по себе достаточна для фенотипического выражения биотехнологически ценного признака. Утрата этого признака наступает лишь при одновременной потере всех мутаций – событие на несколько порядков менее вероятное, чем единичное изменение в геноме.
- Создание селективных условий, в которых преимущество получает интересующий нас штамм. Это магистральный путь борьбы как с утратой ценных свойств продуцентом, так и с ростом в биореакторе посторонней микрофлоры.

К сожалению, во многих случаях ни один из рассмотренных методов борьбы с утратой ценных свойств биообъектом на сегодняшний день не является эффективным, дающим 100 %-ную гарантию. Единственный путь, остающийся в этих условиях, это частая смена головного ферментера с использованием свежего материала для каждого нового засева.

### **Контрольные вопросы**

1. Что такое накопительные и чистые культуры микроорганизмов? Критерии при отборе продуцентов.
2. Указать недостатки метода «мутагенез и селекция» для получения имеющих коммерческую ценность организмов с улучшенными свойствами. Раскройте понятия «индуцированный мутагенез», «мутагены».
3. Требования, предъявляемые к питательным средам. Классификация питательных сред.
4. Перечислите основные методы получения генов. Каким способом можно ввести ген в вектор?
5. Как осуществляется перенос генов в клетки организма-реципиента? На чем основана идентификация клеток-реципиентов, которые приобрели желаемый ген (гены)?
6. Перечислите и опишите методы хранения микробиологических штаммов.
7. Перечислите этапы получения гибридных клеток. Возможности метода слияния клеток.

## **1.2. Типы биотехнологических процессов. Биореакторы. Отделение, очистка и модификация продуктов**

### **1. Субстраты для культивирования биообъектов**

Питательная среда обеспечивает жизнедеятельность, рост и развитие биообъектов, эффективный синтез целевого продукта. Неотъемлемой частью служит вода, все процессы жизнедеятельности протекают только в водной среде. Питательные вещества образуют в среде истинные (минеральные соли, сахара, аминокислоты, карбоновые кислоты, спирты, альдегиды и т.д.) или коллоидные (белки, липиды, неорганические соединения типа гидроксида железа) растворы. Отдельные компоненты могут находиться в твердом агрегатном состоянии – они могут всплывать на поверхность раствора (частицы угля, серы), равномерно распределяться по всему объему в виде взвеси или образовывать придонный осадок. Жидкие углеводороды при внесении в воду формируют особую несмешивающуюся фазу. При твердофазном культивировании вода только увлажняет твердую поверхность субстрата. Вещества, необходимые для культивирования, могут представлять собой газы, растворимые в воде: хорошо ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ), умеренно ( $\text{CO}_2$ ) или плохо ( $\text{N}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ).

Питательные среды могут иметь неопределенный состав, т.е. включать биогенные (растительные, животные, микробные) добавки – мясной экстракт, кукурузную муку, морские водоросли и т.д. Подобные среды обычно готовят на водопроводной воде. Применяют также среды, приготовленные из чистых химических соединений в заранее определенных соотношениях, так называемые синтетические среды. Смесь веществ, как правило, вносят в дистиллированную воду (иногда бидистиллированную).

Среды обоих типов имеют как преимущества, так и недостатки. С экономической точки зрения наиболее целесообразно употребление природного, более дешевого сырья, а не смеси веществ, полученных в чистом виде. Однако только применение сред строго определенного состава позволяет точно регистрировать и регулировать протекающие в биореакторе процессы, добиваться их оптимизации. Компромиссным подходом является использование полусинтетических сред, в состав которых вместе с соединениями известной химической природы входят биогенные добавки.

Отделение приготовления питательной среды представляет собой цех, оборудованный емкостями для хранения жидких и твердых веществ, средствами их транспортировки и аппаратами с перемешивающими устройствами для приготовления растворов, суспензий или эмульсий. При этом питательные соли хранятся обычно в твердом виде, а приготовление их смеси с заданным соотношением компонентов производится в аппарате с мешалкой, куда подаются

твердые компоненты в необходимом количестве, и далее происходит их растворение. Иногда соединяются и перемешиваются заранее приготовленные растворы. Жидкие и твердые источники углерода обычно вводят в уже готовую питательную среду непосредственно перед ферментацией, так как это устраняет опасность заражения посторонней микрофлорой, вероятность которого возрастает при хранении готовой питательной смеси.

Таблица 2

**Питательные субстраты, широко применяемые в биотехнологии**

Субстрат	Назначение	Сырье для получения субстрата
Глюкоза	Источник углерода и энергии	Крахмал, целлюлоза (химический или ферментативный гидролиз)
Сахароза	-<<-	Сахарный тростник, сахарная свекла, канадский клен
Лактоза	-<<-	Молочная сыворотка, отделяемая в процессе изготовления масла, творога, сыра
Крахмал	-<<-	Картофель, кукуруза, пшеница, рожь, ячмень, рис, маниок, бананы и т.д.
Целлюлоза	-<<-	Древесина и сельскохозяйственные отходы
Этанол	-<<-	Разнообразные источники – от сахаристых субстратов (сбраживание) до продуктов гидролиза древесины и компонентов нефти и газа (химический синтез)
Метанол	-<<-	Разнообразное сырье, в первую очередь – растительное (гидролиз)
Алканы	-<<-	Природный газ, нефть и газовый конденсат
Аммиак и соли аммония	Источник азота	Минеральные источники сырья
Сульфитные щелока	Источник углерода, энергии, минеральных солей	Древесина, побочный продукт ее переработки
Гидролизаты древесины, соломы и др.	Источник углерода, энергии, минеральных солей	Древесина, травяная масса и др. Мягкий гидролиз. Гемиллюлозы распадаются до моно- и олигосахаридов.
Растительные масла и животные жиры	Источники углерода и энергии	Растительное и животное сырье
Дрожжевой экстракт	Источник углерода, энергии, азота, минеральных солей	Получают из пивных или пекарских дрожжей путем автолиза
Соевая мука	Источник углерода, энергии, азота, минеральных солей	Получают из соевых бобов после удаления масла

При *непрерывном культивировании* в производстве микробного белка углеродороды и растворы солей вводят в ферментер отдельно по индивидуальным линиям, а смешение и эмульгирование нерастворимых в воде n-алканов

происходит уже в самом биореакторе. При культивировании бактерий на метане последний постоянно барботируют в аппарат через специальные устройства.

При *периодической ферментации* в начале процесса инокулят (засевная доза микроорганизмов) вносится в уже готовую питательную среду, содержащую все компоненты. Поэтому источники углерода вводят непосредственно перед засевом или отдельные компоненты среды вводят по мере потребления их культурой, поддерживая в ферментере некоторую оптимальную их концентрацию, которая на разных этапах ферментации может меняться по определенному закону.

### **Требования, предъявляемые к питательным средам**

1. Питательные среды должны содержать необходимые для питания микробов питательные вещества.
2. Иметь реакцию рН, оптимальную для выращиваемого вида микроба.
3. Питательные среды должны иметь достаточную влажность и вязкость, т.к. микробы питаются по законам диффузии и осмоса.
4. Обладать изотоничностью и иметь определенный окислительно-восстановительный потенциал ( $\text{гН}_2$ ).
5. Питательные среды должны быть стерильными, обеспечивая тем самым возможность выращивания чистых культур.

Потребность в питательных веществах и физических условиях у различных видов микробов неодинакова, и этим исключается возможность создания универсальной питательной среды.

По консистенции различают *плотные* и *жидкие* питательные среды. Плотные готовят на основе жидких посредством прибавления к ним клеевых веществ: агар-агара или желатина. Агар-агар (по-малайски – желе) – продукт растительного происхождения, добывается из морских водорослей. В воде агар-агар растворяется при температуре 80–86°C, затвердевает при 36–40°C и поэтому используется для уплотнения питательных сред для выращивания разных групп микроорганизмов при оптимальной для них температуре.

## **2. Принцип действия и конструкции биореакторов**

Биотехнологические процессы принципиально не отличаются от процессов химического синтеза. Для них характерны такие этапы, как загрузка субстратов для реакций синтеза, превращения субстратов, отделение и очистка целевого продукта. Процессы обоих типов могут быть периодическими и непрерывными. Существуют принципы, общие по форме, но различающиеся по практической реализации.

**Принцип масштабирования** – поэтапного увеличения объема аппаратов.

**Принцип однородности физико-химических условий** – температуры, рН, концентрации растворенных веществ, включая  $O_2$  и другие газы, во всем объеме аппарата.

В биотехнологических процессах нередко используют реакторы для химического синтеза, что, однако, порождает серьезные проблемы. Специфика биотехнологических процессов состоит в том, что в них принимают участие живые клетки, субклеточные культуры или выделенные из клеток ферменты и их комплексы. Это оказывает существенное влияние на процессы **массопередачи** – обмена веществом между различными фазами (например, перенос кислорода из газовой фазы в жидкую) и **теплообмена** – перераспределения тепловой энергии между взаимодействующими фазами. Поэтому важной составной частью биореактора является система перемешивания, служащая для обеспечения однородности условий в аппарате, эффективной массопередачи между водной фазой в биореакторе и пузырьками газа или частицами твердого субстрата, между культуральной жидкостью и культивируемыми клетками, а также в пределах жидкости между ее различными слоями.

Многие биотехнологические процессы относятся к числу *аэробных* – они требуют для своего осуществления *аэрации*, т.е. снабжения кислородом. Для аэрации культуральной среды используют воздух или воздух, обогащенный кислородом, реже чистый кислород. Процессы, протекающие без доступа кислорода (анаэробные нередко зависят от газообразных субстратов или требуют отвода газообразных продуктов жизнедеятельности).

Фундаментальной характеристикой массопередачи между газом и жидкостью служит **объемный коэффициент массопередачи** соответствующего газа. Этот коэффициент показывает, какова скорость переноса молекул газа из газовой фазы в жидкую при заданной разности концентраций газа между двумя фазами. Объемный коэффициент массопередачи зависит от характеристик среды культивирования и аппарата. Он существенно меняется при внесении в среду биообъекта, обычно в сторону увеличения. Это объясняется активным поглощением газа (в рассматриваемом случае  $O_2$ ) клетками, что способствует поступлению его новых порций в жидкость из газовой фазы.

Увеличение объемного коэффициента массопередачи особенно характерно для разработанных в последние годы биотехнологических процессов, поскольку:

- 1) применяют концентрированные популяции клеток;
- 2) широко используемая иммобилизация клеток и их компонентов на носителях ведет к активации поглощения  $O_2$  из среды.

Коэффициент массопередачи представляет собой важнейшую характеристику процесса, исходя из которой проводят расчет, оптимизацию и масштабирование уровня аэрации среды для культивирования биообъекта.

Теплообмен представляет собой также важную составную часть процессов, протекающих в биореакторе, поскольку жизнедеятельность и метаболическая активность биообъекта зависят от температуры. Узкий диапазон температур, оптимальных для биотехнологического процесса, диктуется:

- 1) резким спадом активности ферментов по мере снижения температуры;
- 2) необратимой инактивацией (денатурацией) биологических макромолекул (белков и нуклеиновых кислот) при повышении температуры до определенного уровня.

Температурный оптимум варьирует от организма к организму, от процесса к процессу. Большинство освоенных биотехнологических процессов протекает при температурах 30–50°C (мезофильные условия). Это имеет свои преимущества, поскольку для поддержания оптимума температуры лишь в редких случаях приходится прибегать к специальному подогреву. Серьезной проблемой, однако, является удаление избыточной теплоты, выделяемой в процессе жизнедеятельности культивируемых клеток, поэтому биореактор должен иметь систему теплообмена.

**Теплообмен** описывается уравнением, связывающим теплоту  $Q$ , переданную в единицу времени от одной фазы к другой (например, между внутренним объемом реактора и окружающей средой или между этим объемом и системой теплообмена), с площадью поверхности теплообмена  $A$  и межфазной разностью температур  $\Delta T$ .

$$Q = UA\Delta T$$

**Коэффициент теплопередачи**  $U$  соответствует количеству теплоты, которая передается в единицу времени через единичную поверхность при разности температур в 1°C. Из уравнения следует, что повысить скорость передачи теплоты между внутренним объемом и системой можно путем:

- 1) повышения коэффициента теплопередачи;
- 2) увеличения поверхности теплообмена;
- 3) увеличения разности температур.

Серьезной проблемой для аэрируемых процессов в биотехнологии является вспенивание культуральной среды – образование на ее поверхности слоя из пузырей. **Пенообразование** связано с наличием в среде поверхностно-активных веществ (ПАВ), к числу которых относятся продукты распада жиров – мыла, а также белки. Белковые вещества содержатся в среде как питательные субстраты (белки соевой, кукурузной муки и т.д.) или представляют собой продукты жизнедеятельности организмов. Как правило, ПАВ включают как поляр-

ные (или ионные), так и неполярные группировки. Заряженные группы имеют сродство к воде и локализуются в водной фазе, а нейтральные выталкиваются из воды в воздушную фазу. Это придает ПАВ ориентацию на границе раздела фаз вода/воздух. Встраиваясь в стенки газовых пузырьков, ПАВ значительно удлиняют время их жизни. Пенный слой поверх среды культивирования в биореакторе имеет двойное значение. Пена способствует росту многих аэробных микроорганизмов. В пенном слое – «кислородном коктейле» – наибольший прирост дают дрожжи. Внедряясь в границу раздела вода/воздух, пенообразующие ПАВ стимулируют массопередачу между этими фазами, снижая затраты на перемешивание и аэрацию. Нежелательные последствия вызывает избыточное пенообразование. Оно ведет к сокращению полезного объема биореактора, создает угрозу заражения культуры посторонней микрофлорой. Поэтому необходимой составной частью реактора служит **система пеногашения**.

**Система стерилизации** представляет собой специфический элемент биореактора, не имеющий аналогов в аппаратах химической технологии. Устранение посторонней микрофлоры из реактора до введения в него штамма-продуцента, поддержание чистоты культуры на всем протяжении биотехнологического процесса, надежная стерилизация питательных сред, добавочных компонентов, титрантов, пеногасителей, подаваемого в биореактор воздуха – все это рассматривается как **принцип асептики** биотехнологического производства.

Все более широкое применение в биотехнологии находит **принцип дифференцированных режимов** культивирования: разные этапы одного процесса целесообразно осуществлять при различных условиях, варьируя такие параметры, как температура, рН среды и т.д.

По общности специфических технологических признаков микробиологические производства можно разделить на две группы:

- **многотоннажные** микробиологические производства, направленные на получение значительных масс микроорганизмов (дрожжей) или больших объемов целевых продуктов – органических кислот (уксусной, молочной, лимонной), спиртов и т.п. (табл. 3)

- производства **тонкого микробиологического синтеза**, направленные на получение бактериальных препаратов и соединений сложной органической структуры, бóльшая часть которых обладает биологически активными свойствами (ферментные препараты, антибиотики, аминокислоты, витамины, стимуляторы роста, гормональные препараты и т.п. (табл. 4).

Таблица 3

### Многотоннажные микробиологические производства

Особенности производств	Требования к оборудованию
<p>Культивирование ведут в условиях, в которых развитие посторонней микрофлоры затруднено, например:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• в кислой среде при pH 4...5;</li> <li>• при повышенной температуре - в производстве молочной кислоты при 50°C;</li> <li>• при применении анаэробных культур;</li> <li>• при спиртовом или уксуснокислом брожении вырабатываются ингибиторы, подавляющие рост микроорганизмов-контаминантов).</li> </ul>	<p>Не предъявляют жестких требований к обеспечению асептики, надежной герметизации оборудования, стерилизации сырья, материалов, воздуха, коммуникаций, аппаратуры и пр.</p>
<p>Продукты в основном несложны по химическому составу и имеют молекулярную массу до 100. (Поэтому микробиологический способ производства продуктов этой группы - этанола, бутанола, уксусной кислоты и др. сокращается, поскольку оказывается не конкурентоспособными с органическим синтезом. Но эта тенденция не характерна для дрожжевых производств.)</p>	<p>Конструктивное развитие микробиологического оборудования для производства указанных продуктов ограничивается отсутствием их технологической перспективы. Развитие оборудования для производства БВК в настоящее время осуществляют в основном в направлении повышения его экологической безопасности.</p>
<p>Целевые продукты достаточно термолабильны.</p>	<p>Не требуется разработка конструкций, обеспечивающих особо «мягкие» тепловые условия выделения.</p>
<p>Выделение готовых продуктов относительно простое и немногостадийное, например, сепарация дрожжей, ректификация растворителей и т. п.</p>	<p>Состав применяемого технологического оборудования относительно невелик.</p>

Таблица 4

### Производства тонкого микробиологического синтеза

Особенности производств	Требования к оборудованию
<p>Культивирование микроорганизмов осуществляют в условиях, близких к оптимальным для большинства микроорганизмов – контаминантов (pH 6,2...7,2; температуре 25... 35°C) на средах, содержащих углеводы, растительный белок, фосфорные и азотистые соли. Поэтому посторонняя микрофлора может подавить развитие культуры или резко снизить выход продуктов метаболизма.</p>	<p>Повышенные требования к защите технологических сред на стадии культивирования, а иногда и на стадиях выделения от посторонней микрофлоры, что влечет за собой применение оборудования для тонкой и бактериальной очистки воздуха, надежной стерилизации питательных сред и добавок. В основном технологическом оборудовании обеспечивают надежную герметизацию, тепловую стерилизацию, асептический отбор проб и т.п.</p>
<p>Продукты тонкого микробиологического синтеза большей частью выпускают в сухом виде расфасованными в герметичную тару относительно небольшой вместимости.</p>	<p>В состав производства входит оборудование для проведения финишных операций.</p>

## **Общие особенности оборудования микробиологических производств**

### **➤ Очень большая вместимость биореакторов.**

Это обусловлено следующими обстоятельствами. Концентрация целевых продуктов в культуральных жидкостях очень мала, как правило, несколько килограммов, а иногда граммов в  $1 \text{ м}^3$ , например:

- витамина  $\text{B}_{12}$  содержится  $5 \dots 15 \text{ г/м}^3$ ;
- содержание биомассы при производстве бактериальных препаратов обычно не превышает  $1 \dots 2 \%$ ;
- концентрацию некоторых органических кислот (лимонной, глутаминовой), ферментов, лизина удается довести до десятков килограммов в  $1 \text{ м}^3$ .

### **➤ Очень большие габариты оборудования.**

Большие габариты оборудования обусловлены не только повышенной вместимостью, но и конструктивными параметрами, обеспечивающими:

- «мягкие» условия обработки продуктов биосинтеза (например, в распылительных сушилках для биологических объектов. В частности, при одинаковой производительности распылительная сушилка на основе того же принципа действия, но предназначенная для химических производств, менее громоздка);
- повышенную производительность оборудования для быстрой переработки лабильных биологических продуктов.

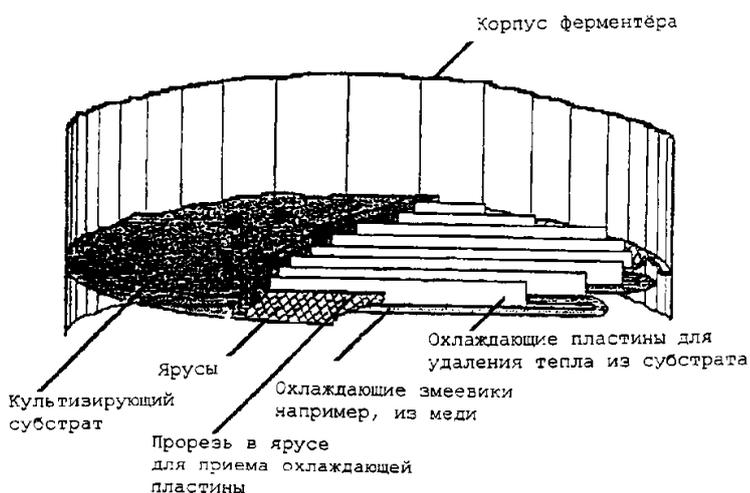
### **➤ Применение самых современных систем перемешивания.**

Это обусловлено тем, что культуральные жидкости представляют собой сложные объекты перемешивания, а при культивировании микроскопических грибов и актиномицетов они словно «армированы», что составляет дополнительную трудность при перемешивании. Поэтому до определенного критического значения удельной вводимой мощности эффективного перемешивания культуральной жидкости не происходит.

**По основной фазе**, в которой протекает процесс ферментации, различаются:

1. **Поверхностная (преимущ. твердофазная) ферментация** (культивирование на агаровых средах, на зерне, производство сыра и колбас, биокомпостирование и др.) осуществляется в периодическом режиме.

2. **Глубинная (преимущ. жидкофазная) ферментация**, где биомасса микроорганизмов суспендирована в жидкой питательной среде, через которую при необходимости продувается воздух или другие газы, осуществляется в периодическом и различных вариантах непрерывного культивирования.



**Твердофазный ферментер**

Исторически первой сложилась технология твердофазного культивирования, возникшая в Юго-Восточной Азии в условиях кустарного производства ферментных препаратов. Твердофазное культивование – это выращивание микроорганизмов на увлажненных, хорошо аэрируемых твердых (сыпучих) средах.

Таблица 5

**Преимущества твердофазного и глубинного культивирования**

<b>Твердофазное культивирование</b>	<b>Глубинное культивирование</b>
Скорость биосинтеза в несколько раз (в 5–8 раз) выше.	Меньшая потребность в производственной площади.
Общая продолжительность культивирования для получения одной и той же активности в 2–3 раза короче.	Высокая степень механизации (исключается тяжелый ручной труд).
Меньше затраты электроэнергии (не требуется интенсивное перемешивание и меньше затраты энергии на сушку).	Обеспечивается стерильность процесса.
Существенно меньшее образование сточных вод.	Простота механизации процесса и стерилизации сред и оборудования.
Характер субстрата облегчает выделение и очистку продукта.	Улучшается гигиена труда.
Малое содержание влаги в субстрате препятствует инфицированию культуры.	Проще осуществить непрерывный способ культивирования.
	Более рациональное использование питательных веществ сред, и, следовательно, сокращение отходов производства.
	Получение целевого продукта с меньшим содержанием побочных примесей и с большей удельной активностью.
	Возможность интенсификации процесса за счет непрерывного отвода метаболитов через селективную мембрану.

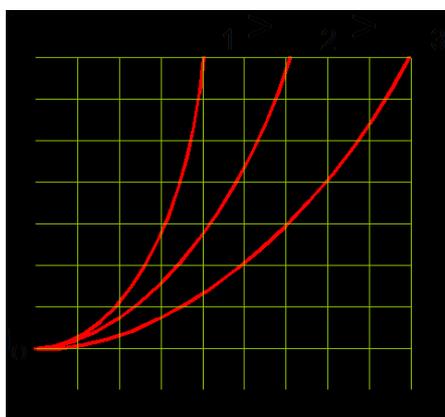
## Недостатки твердофазного и глубинного культивирования

Твердофазное культивирование	Глубинное культивирование
Более низкий уровень промышленного технологического оборудования.	Более высокие требования к технологическим стадиям.
Сложность тепло- и массообмена.	Получение более разбавленных растворов целевого продукта (обычно 1–3 %), что повышает стоимость стадии концентрирования.
Более тяжелые и вредные условия труда.	
Нестерильность процессов.	
Пригодность лишь для аэробных культур	

В основу расчетов биореакторов положена **КИНЕТИКА** – учение о скорости протекания процессов.

- **МАКРОКИНЕТИКА** описывает развитие микроорганизмов в реальных условиях в большом объеме, в котором развиваются миллиарды микроорганизмов при массовом движении микрочастиц – микроорганизмов, частиц субстрата, капель, струй, пузырей и пр.

- **МИКРОКИНЕТИКА** описывает элементарные процессы, протекающие на молекулярном уровне независимо друг от друга, с учетом предположения об упрощенном механизме их существования.



К таким процессам относят: молекулярную диффузию, теплопроводность, обмен веществ биообъекта – усвоение им продуктов внешней среды, выделение продуктов метаболизма и пр.

Рост биомассы, концентрации микроорганизмов и количества клеток описывают экспоненциальной зависимостью.

Удельную скорость роста  $\mu$  можно представить в виде произведений ряда функций, каждая из которых характеризует влияние того или иного параметра культивирования на  $\mu_m$ ,

$$\mu = \mu_m f_1(t) f_2(\text{pH}) f_3(\text{C}) f_4(\text{S}) f_5(\text{P}) \dots$$

где  $\mu_m$  – максимальное, предельно возможное значение  $\mu$  при самых благоприятных условиях;  $\mu_m$  – кинетическая константа.

Эту функциональную зависимость можно дополнить функциями от некоторых других параметров, например, концентрации диоксида углерода, окислительно-восстановительного потенциала и пр.

В реальных условиях культивирования удельная скорость роста  $\mu$  всегда ниже своего максимально возможного значения  $\mu_m$ , являющегося кинетической константой, определяемой экспериментально. Это обусловлено тем, что она зависит от множества различных факторов. Рассмотрим это выражение, исходя из принципа независимости, в соответствии с которым удельная скорость роста не зависит от не изменяющихся (постоянных) параметров. То есть, если группу параметров, кроме одного, поддерживать на постоянном уровне, то удельная скорость роста будет зависеть только от этого одного переменного параметра.

Кислород плохо растворим в жидкости. Например, равновесная концентрация растворенного кислорода в воде при нормальных условиях и при контакте ее с воздухом, в котором 21 %  $O_2$  (то есть при парциальном давлении 150 мм. рт. ст.), составляет около 7 г/м<sup>3</sup>. В культуральных жидкостях, представляющих солевые растворы, растворимость кислорода ниже и обычно лежит в пределах 4–6 г/м<sup>3</sup>. В то же время скорость потребления кислорода большинством микроорганизмов достаточно велика и составляет 0,2–0,3 г/(м<sup>3</sup>×с). При такой интенсивности дыхания растворенный кислород будет потреблен культурой за очень короткий промежуток времени. Поэтому системам аэрации в биореакторах уделяется большое внимание.

Таким образом, в согласии с основными принципами реализации биотехнологических процессов современный биореактор должен обладать системами:

- ✓ эффективного перемешивания и гомогенизации питательной среды;
- ✓ обеспечения доступа и быстрой диффузии газообразных агентов (наиболее часто речь идет о системе аэрации среды);
- ✓ теплообмена, отвечающего за поддержание температуры внутреннего объема биореактора и (или) за ее контролируемые изменения;
- ✓ пеногашения;
- ✓ стерилизации сред, аппаратуры и воздуха;
- ✓ контроля и регулировки процесса.

### **Классификация биореакторов:**

- по направленности биологических процессов;
- по способу культивирования;
- по структуре рабочего цикла;
- по условиям асептики;
- по условиям аэрации;
- по способу ввода энергии;
- по организации перемешивания и аэрации и т.д.

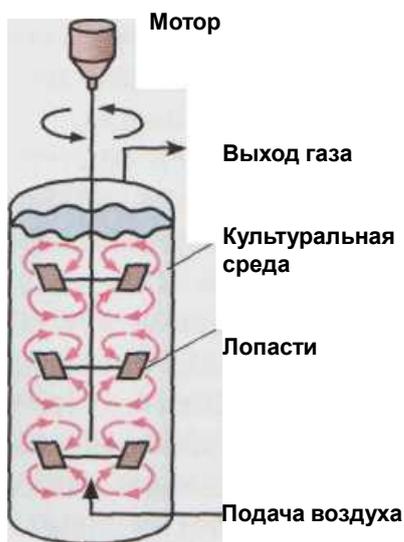
### **3. Системы перемешивания и аэрации**

Устройство и механизм действия систем перемешивания и аэрации варьируют и составляют важный принцип классификации биореакторов различных

типов. По способу перемешивания и аэрации биореакторы подразделяются на аппараты с механическим, пневматическим и циркуляционным перемешиванием.

**Аппараты с механическим перемешиванием.** Эти аппараты имеют механическую мешалку, состоящую из центрального вала и лопастей (обычно 6, реже 8) различной формы (прямых или изогнутых). Эффективное перемешивание

#### Аппараты с механическим перемешиванием.



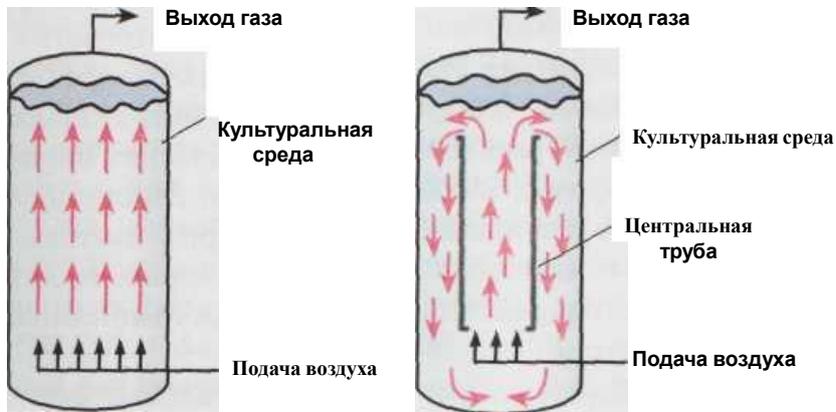
жидкости в больших объемах обеспечивается в том случае, если мешалки многоярусны, лопасти расположены в несколько этажей. В систему перемешивания входят также отражательные перегородки – узкие металлические пластины, прикрепленные к внутренним стенкам реактора. Эти перегородки предотвращают возникновение водоворота вокруг вращающейся мешалки, переводя круговое движение жидкости

в вихревое, равномерно распределенное по всему объему. Иногда отражательные перегородки неприменимы, поскольку они обрастают микроорганизмами, в частности мицелиальными грибами, что резко ухудшает условия аэрации и перемешивания в аппарате. Для выращивания грибов используют мешалки с плоскими лопастями, не разрывающими мицелий. Очень нежное, медленное перемешивание производится в аппаратах, предназначенных для культивирования клеток животных и растений. Аэрация может осуществляться путем барботаж – подачи воздуха снизу через барботер, горизонтальную трубку с отверстиями (щелями). Разбрызгиванию пузырьков (или другого аэрирующего газа) в виде мелких пузырьков способствует механический вибратор, установленный в непосредственной близости от барботера. В некоторых аппаратах используется полая мешалка, воздух поступает в среду культивирования через нижний конец ее вала и полые лопасти. В аппаратах с полой мешалкой часто непосредственно над лопастями аэрирующей мешалки устанавливают диффузор – открытый снизу и сверху цилиндр, который делит объем биореактора на два отсека – внутренний и внешний по отношению к стенкам диффузора.

## Аппараты с пневматическим перемешиванием

В аппаратах пневматического типа мешалка отсутствует, перемешивание

### Аппараты с пневматическим перемешиванием.

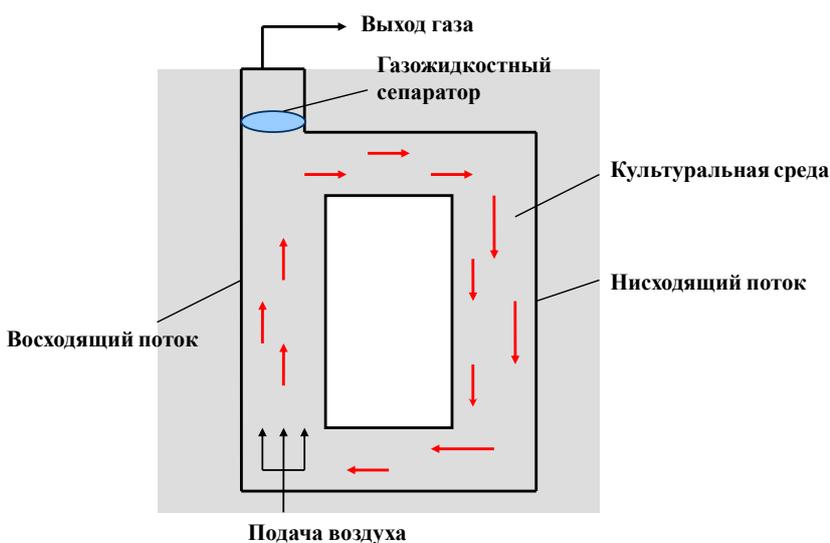


осуществляется пузырьками газа. Скорость массопередачи между газом и жидкостью ниже. Перемешивание и аэрация усиливаются с помощью вращающихся дисков с отверстиями, установленных вблизи барботера, или с помощью придонных пропеллеров.

Так называемый классический эрлифтный аппарат дополнен диффузором, нижний обрез которого находится непосредственно над барботером. На пневматическом перемешивании основаны многие колоночные биореакторы, разделенные горизонтальными перегородками на этажи. Характеризуются плавным перемешиванием, зарекомендовали себя при культивировании клеток животных и растений. Преимущества: более экономичные, не возникает сильных гидродинамических возмущений, нет заражения посторонней микрофлорой с помощью механической мешалки.

## Аппараты с циркулярным перемешиванием

### Аппараты с циркулярным перемешиванием.



Содержат устройства (насосы, эжекторы), создающие направленный ток жидкости по замкнутому контуру. Жидкость увлекает за собой пузырьки газа. Насос для циркуляции культуральной жидкости может соседствовать с барботером (сочетание пневматического и циркулярного перемешивания).

#### **4. Системы теплообмена, пеногашения, стерилизации биореакторов**

##### **Системы теплообмена**

Теплообмен достигается с помощью труб с охлаждающим или нагревающим агентом, оплетающих корпус аппарата (рубашка), или пропущенных непосредственно через его полость (часто в виде змеевиков).

##### **Системы пеногашения**

Химические пеногасители – поверхностно-активные вещества, внедряясь в стенки пузырьков воздуха, становятся центром их неустойчивости. Применяют растительные (соевое, рапсовое, кокосовое, подсолнечное, горчичное) масла, животные (сало, рыбий жир) и минеральные жиры.

Механические пеногасители – устройства, сбивающие пену: лопасти, диски, барабаны в верхней части биореактора.

##### **Системы стерилизации**

*Термические*, самые распространенные, при температурах порядка 120–150°C:

- ✓ нагревание объекта;
- ✓ острым паром под давлением;
- ✓ глухим паром, изолированным от стерилизуемых сред металлической стенкой;
- ✓ паром, генерируемым в самом стерилизуемом сосуде с помощью электронагревателей;
- ✓ автоклав (аппарат, где вода доводится до кипения при повышенном давлении).

*Химические: дезинфицирующие агенты* ( $\beta$ -пропиолактон, окись этилена, окись пропилена), самопроизвольно разлагающиеся в воде без образования токсичных продуктов. Основная проблема в этом случае – необходимость устранения стерилизующего агента из питательной среды после гибели микрофлоры до внесения инокулята. Химические антисептики должны быть не только высокоэффективны, но и легко разлагаемы при изменении условий после завершения стерилизации. К числу лучших относится пропиолактон, обладающий сильным бактерицидным действием и легко гидролизуемый в молочную кислоту.

*Фильтрационные:* пропускание газов (жидкостей) через волокнистые фильтры с последовательно расположенными фильтрующими элементами, задерживающие микроорганизмы. Фильтрующий материал периодически стерилизуется подачей острого пара в отключенный фильтр через заданные промежутки времени. Жидкостные потоки стерилизуют различными методами, из которых практический интерес представляют термический, радиационный, фильтрационный и отчасти химический. Мало распространен метод фильтрации, что объясняется аппаратными трудностями. Метод основан на способности полу-

проницаемых мембран с крупными порами пропускать жидкую фазу и концентрировать клетки микроорганизмов. В принципе этот метод является идеальным для стерилизации термически неустойчивых жидких и газовых средств, поскольку может осуществляться при низкой температуре и требует лишь градиента давления по разные стороны мембраны. Основная трудность – наличие термостойких мембран, способных выдерживать многократную стерилизацию их самих. В настоящее время эта проблема решается путем применения термостойких полимеров в производстве мембран.

**Радиационные:** обработка ультрафиолетовыми и радиоактивными излучениями,  $\gamma$ -излучение применяется редко из-за трудностей создания и эксплуатации мощных источников этого излучения. Ряд субстратов не требует стерилизации, так как они сами обладают асептическим действием; сюда относят метанол, этанол, концентрированная уксусная кислота и др. В этом случае ограничиваются стерилизацией прочих элементов питательной среды.

### **5. Лабораторные, пилотные и промышленные биореакторы**

**Лабораторные биореакторы.** Объем биореактора 0,5–100 литров. Напоминают промышленные по форме и устройству перемешивания и аэрации. Решают задачи: кинетические (измеряют скорость роста клеток, утилизации субстратов, образования целевого продукта), некоторые массообменные (рассчитывают коэффициенты массопередачи, объем поступления кислорода, объем освобождения от газообразных продуктов), стехиометрические (устанавливают коэффициенты в брутто-уравнениях химических реакций). Генератор теплоты – механическая мешалка, вклад метаболических процессов в разогрев среды незначительный, можно поместить реактор в водяную баню.

**Пилотные биореакторы.** Объем биореактора 100 литров – 5 м<sup>3</sup> (опытно-промышленные). Дублируют конструкционные детали промышленного аппарата, исследуют макрокинетику процесса. На этом этапе выбирают тип аппарата, который далее применяют в промышленном масштабе. Уменьшается соотношение между поверхностью и объемом аппарата, что затрудняет теплообмен через стенки аппарата.

### **6. Биотехнологические процессы периодического и непрерывного действия**

**Периодические процессы** включают:

- стерилизацию сред, биореактора;
- загрузку аппарата питательной средой;
- внесение посевного материала (клеток, спор);
- рост культуры;
- синтез целевого продукта;
- отделение, очистку готового продукта.

Применяют периодическое культивирование с подпиткой (в процессе добавляют питательные вещества), отъемно-доливочное культивирование (часть объема из биореактора время от времени изымается при добавлении эквивалентного объема среды), культивирование с диализом (субстрат непрерывно поступает в культуральную жидкость).

*Биореакторы периодического действия* характеризуются:

- единством места проведения всех стадий технологической операции;
- одновременностью этих стадий;
- различием параметров на этих стадиях.

Фазы, которые проходят микроорганизмы при периодическом культивировании:

- лаг фаза;
- фаза экспоненциального роста; в экспоненциальную фазу обычно синтезируются, так называемые, первичные метаболиты (витамины, многие ферменты);
- фаза замедленного роста;
- стационарная фаза; в стационарную фазу обычно синтезируются, так называемы, вторичные метаболиты (антибиотики, красящие вещества и т.п.);
- фаза отмирания (автолиз).

Современные периодические процессы основаны на принципе дифференцированных режимов культивирования, в соответствии с которым для каждой фазы процесса подбирают оптимальные условия аэрации, перемешивания, рН и температуры.

**Непрерывные процессы:**

*Оборудование непрерывного действия* характеризуется:

- одновременностью протекания всех стадий технологической операции;
- неизменностью параметров на этих стадиях;
- разобщенностью этих стадий в пространстве (т.е. они осуществляются в различных частях машины, аппарата или различных машинах и аппаратах единой технической системы).

Биообъект постоянно поддерживается в экспоненциальной фазе роста, обеспечивается непрерывный поток свежей питательной среды в биореактор и отток из него культуральной жидкости, содержащий клетки и продукты их жизнедеятельности.

$$\mu = D$$

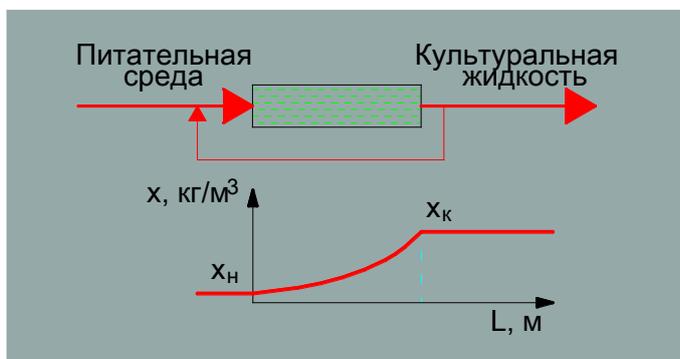
$\mu$  – удельная скорость роста клеток

$D$  – коэффициент разбавления (скорость убыли концентрации клеток)

Фундаментальным принципом непрерывных процессов служит равновесие между приростом биомассы за счет деления клеток и их убылью в результате разбавления свежей средой.

По характеру процессов, которые в них протекают, аппараты непрерывного действия можно разделить на:

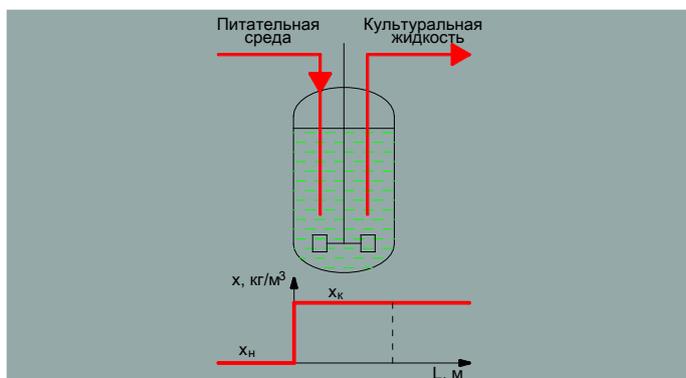
- **аппараты идеального (полного) вытеснения**



Для аппаратов этого типа характерно стержневое течение среды. Продольное перемешивание среды осуществляется за счет турбулентности потока.

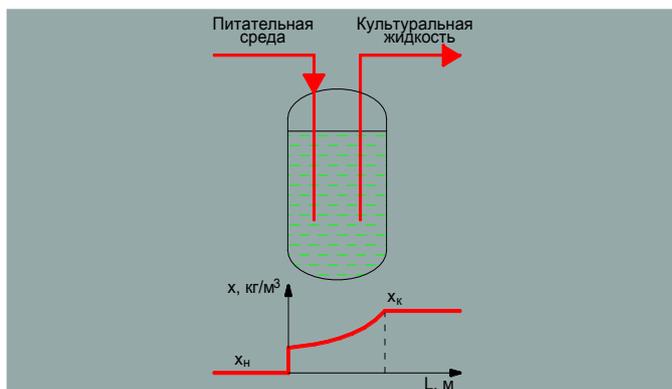
- ✓ недостаточная подвижность клеток;
- ✓ трудность регулирования pH;
- ✓ трудность тепло- и массопереноса;
- ✓ необходимость постоянного засева.

- **аппараты идеального (полного) смешения**



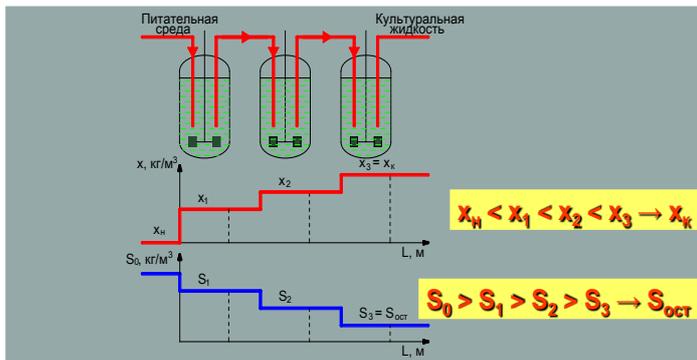
Для аппаратов этого типа характерна высокая интенсивность перемешивания среды с введением в аппарат большой мощности.

- **аппараты промежуточного типа**



Для аппаратов этого типа характерна невысокая степень интенсивности перемешивания среды.

При применении многостадийного непрерывного культивирования возможна реализация принципа дифференцированных режимов.



### ***Преимущества непрерывного культивирования микроорганизмов***

- Компактность и меньшая материалоемкость по сравнению с биореакторами периодического действия той же производительности;
- Простота обслуживания, поскольку сокращаются затраты рабочего времени на вспомогательные операции: загрузку и разгрузку биореактора, его мойку и санитарную обработку;
- Простота автоматизации;
- Постоянная работа с полной нагрузкой;
- Более высокое качество получаемого продукта, поскольку культивирование осуществляют в условиях установившегося режима, обеспечивающих оптимальное физиологическое состояние культуры в фазе экспоненциального роста;
- Более высокая продуктивность, чем у биореактора периодического действия, однако концентрация продукта всегда бывает ниже.

### ***Причины, сдерживающие переход на непрерывное культивирование***

- Более высокие требования к герметизации биореакторов для сохранения асептики;
- Более сложное конструктивное устройство аппаратуры и систем контроля, что ведет к увеличению капитальных затрат;
- Загрязнение биомассой внутренних поверхностей биореактора и расположенных внутри его устройств при продолжительном культивировании микроорганизмов, особенно микроскопических грибов;
- Угроза утраты ценных свойств генноинженерных штаммов;
- Инерционность мышления.

## **7. Отделение, очистка, модификация продуктов**

Для промышленных микробиологических процессов характерно, как правило, образование очень разбавленных растворов и суспензий, содержащих, помимо целевого, большое количество других веществ. При этом приходится разделять смеси веществ очень близкой природы, находящихся в растворе в сравнимых концентрациях, весьма лабильных, легко подвергающихся термической деструкции.

## **Отделение биомассы от культуральной жидкости (сепарация)**

1. *Флотация*. Например, сахаромицеты (хлебопекарные дрожжи) имеют относительно большие клетки и способны флотироваться, поэтому после сгущения биомассы флотацией их отделяют на обычных барабанных вакуум-фильтрах. В дальнейшем биомассу, снятую с фильтра, подвергают прессованию и получают продукт с высоким содержанием живых клеток, имеющих высокую хлебопекарную активность.

2. *Фильтрация*. Дрожжи рода *Candida*, служащие источником кормового белка плохо флотируются и фильтруются. Отделение твердой фазы (мелкодисперсный клеточный материал, внутриклеточные биополимеры возможно и методом фильтрации). Так как фильтруемая суспензия склонна к гелеобразованию, то производительность фильтров быстро падает. Предотвратить это можно добавлением в смесь или на фильтрующую ткань размолотых вулканических пород, содержащих оксиды кремния и алюминия, тогда осадки приобретают пористую структуру.

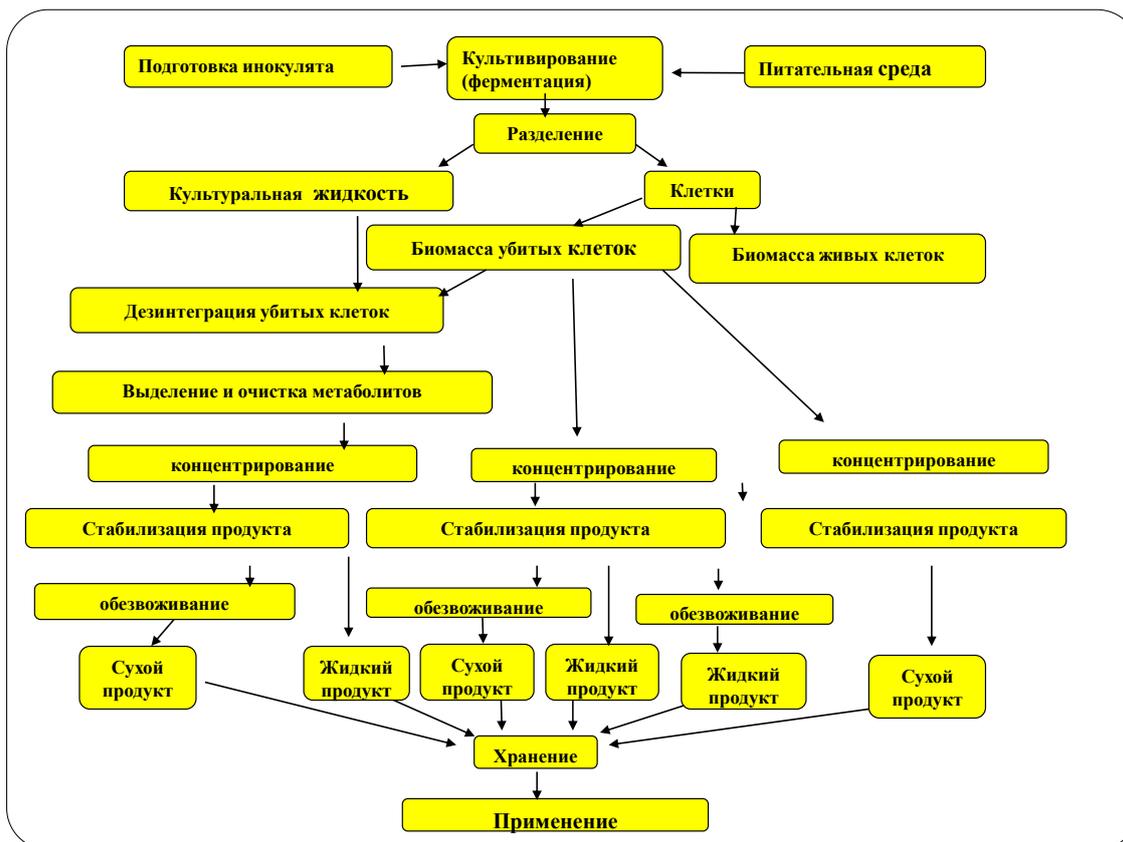
3. *Центрифугирование*. Некоторые виды биомассы отделяют центрифугированием. Осаждение взвешенных частиц происходит под действием центробежной силы. После разделения образуется 2 фракции: биомасса (твердая) и культуральная жидкость.

Методы разрушения клеток. Для выделения и очистки продуктов, находящихся внутри клеток продуцента (например, интерферонов, гормонов), вводится стадия разрушения клеточных оболочек (дезинтеграция биомассы). Обычно для этого применяются механические, химические или комбинированные методы.

**Физические:** к физическим методам дезинтеграции относятся обработка ультразвуком, вращение лопасти или вибратора, встряхивание со стеклянными бусами, продавливание через узкое отверстие под давлением, раздавливание замороженной клеточной массы, растирание в ступке, осмотический шок, замораживание-оттаивание, декомпрессия (сжатие с последующим резким снижением давления).

**Химические:** химические и химико-ферментативные методы более избирательны. Клетки могут быть разрушены толуолом или бутанолом, антибиотиками, ферментами. Культуральную жидкость освобождают от сопутствующих растворимых веществ и фракционируют.

## Основные этапы отделения и очистки биотехнологических продуктов



### Отделение и очистка продуктов

1. *Осаждение* – физическое (нагревание, охлаждение, разбавление, концентрирование) или химическое (с помощью органических и неорганических веществ).

Осаждение органическими растворителями основано на снижении диэлектрической постоянной среды. Устойчивость белковых растворов обусловлена наличием гидратного слоя у молекулы. Если его разрушить, белки осаждаются. Для этого молекулы добавляемых веществ должны быть более гидрофильны, чем молекулы белков. В качестве осадителей используют этанол, метанол, ацетон, изопропанол. При разных количествах растворителя и разных значениях pH осаждаются разные фракции. Пример: 50 % этанол осаждаёт 80 % протеазы и 3–5 % амилазы, 70 % спирт осаждаёт 98 % амилазы.

2. *Экстракция*. При твердожидкофазной экстракции вещество из твердой фазы переходит в жидкую, при жидкожидкофазной – из одной жидкости в другую (например, хлорофилл из спиртовой вытяжки переходит в бензин). Для извлечения антибиотиков, витаминов, каротиноидов, липидов применяют жидкожидкофазную экстракцию, когда культуральную жидкость смешивают с органическими растворителями.

3. *Адсорбция* – частный случай экстракции, когда экстрагирующий агент – твердое тело. Адсорбция применяется для веществ, имеющих функциональ-

ные группы, заряженные положительно или отрицательно. В качестве адсорбента используют иониты на основе целлюлозы: катиониткарбоксиметилцеллюлоза (КМЦ); анионитдиэтиламиноэтилцеллюлоза (ДЭАЭ), а также сефадексы на основе декстрана и т.д. Адсорбция идет по ионообменному механизму.

4. Более тонкую очистку веществ осуществляют несколькими способами.

Наибольшее распространение получила **хроматография**. Каплю образца наносят на специальную бумагу (*хроматография на бумаге*) или пластинку стекла или пластмассы, покрытую тонким слоем инертного сорбента, например, целлюлозы или силикагеля (*хроматография в тонком слое или тонкослойная хроматография*). Затем такую пластинку одним концом помещают в смесь растворителей (например, воды и спирта).

По мере движения растворителей по пластинке, они подхватывают те молекулы образца, которые растворяются в них. Растворители выбирают таким образом, чтобы они связывались сорбентом по-разному. В результате молекулы образца, более растворимые в связанном растворителе, движутся медленнее, а другие, более растворимые в слабо сорбированном растворителе, движутся быстрее. Через несколько часов пластинку сушат, окрашивают и определяют положение различных молекул.

Можно разделять молекулы методом хроматографии на колонках (*колоночная хроматография*). В этом случае смесь молекул в растворе пропускают через колонку, содержащую твердый пористый матрикс. В результате взаимодействия с матриксом различные молекулы проходят через колонку с различной скоростью. После того как они достигнут в определенной последовательности дна колонки, их собирают отдельными фракциями.

В настоящее время разработано и применяется множество матриксов различных типов, используя которые можно делить белки согласно их:

- ✓ заряду (*ионообменная хроматография*);
- ✓ гидрофобности (*гидрофобная хроматография*);
- ✓ размеру (*хроматография гель-фильтрацией*);
- ✓ или способности связываться различными химическими группами (*аффинная хроматография*).

### **Концентрирование продукта**

1. *Осмоз* – мембрана пропускает воду, задерживая растворенные в ней вещества. Прямой осмос – диффузия веществ через мембрану, разделяющую раствор и растворитель. Обратный осмос – если внешнее давление превышает осмотическое.

2. *Ультрафильтрация* – с помощью мембранных фильтров.

3. *Выпаривание*.

### **Обезвоживание продукта**

1. Ленточные сушилки.
2. Сушка в кипящем слое.
3. Барабанные сушилки.
4. Распылительные сушилки.
5. Вакуумные сушильные шкафы.

### **Модификация продукта**

Химическая модификация необходима в случае, когда биотехнологический процесс сам по себе дает лишь «заготовку» целевого продукта (пенициллин G – ампициллин, метиоциллин и т.д.).

### **Стабилизация продукта**

Может служить сушка, обезвоживание, добавление наполнителей из грибного мицелия, пшеничных отрубей и др., стабилизация ферментов – добавление глицерина или углеводов, которые образуют водородные связи с кислотными остатками, или их иммобилизация.

### **Контрольные вопросы**

1. Опишите основные биотехнологические процессы и принципы их реализации. Какое значение в биотехнологии имеют процессы массообмена и теплообмена? Приведите уравнение теплообмена.
2. Чем отличаются многотоннажные микробиологические производства и производства тонкого микробиологического синтеза? Опишите особенности производства и требования к оборудованию.
3. Что представляют собой твердофазный и глубинный способы культивирования, опишите их преимущества и недостатки?
4. Дайте характеристику биореакторов непрерывного и периодического действия.
5. Дайте характеристику биореакторов по способам перемешивания. Какие относительные преимущества и недостатки имеются у данных аппаратов? В чем заключается необходимость деления биореакторов на: лабораторные, пилотные, промышленные?
6. Охарактеризуйте системы теплообмена, пеногашения, стерилизации биореакторов.
7. Как проходит отделение, очистка, модификация продуктов, какие методы применяются?

### 1.3. Имобилизованные ферменты и биокаталитические системы

**Ферменты** – это простые или сложные белки с каталитической активностью, необходимой для осуществления химических реакций в живом организме (метаболизм). Кроме белковых элементов (апоферментов), фермент содержит и



небелковые, которые называют простетической группой или (если их комплекс легко диссоциирует) коферментом. Химическая модификация ферментов, их перенос в неводную среду, обработка с целью стабилизации, белковая инженерия – все эти методы относятся к компетенции **инженерной энзимологии**. Центральный метод инженерной энзимологии – **иммобилизация ферментов**.

инженерной энзимологии – **иммобилизация ферментов**.

**Иммобилизация ферментов** – ограничение подвижности молекул фермента, их конформационных перестроек – основана на физико-химических принципах, позволяющих закрепить структуру фермента таким образом, чтобы активный центр его молекулы сохранял свою работоспособность (каталитическая активность) в течение длительного времени, не подвергаясь структурным изменениям, приводящим к нарушению его конфигурации. Ферменты – вещества белковой природы и поэтому неустойчивы при хранении, а также чувствительны к тепловым воздействиям. Кроме того, ферменты не могут быть использованы многократно из-за трудностей в отделении их от реагентов и продуктов реакции. Решить эти проблемы помогает создание иммобилизованных ферментов. Начало этому методу было положено в 1916 г., когда Дж. Нельсон и Е. Гриффин адсорбировали на угле инвертазу и показали, что она сохраняет в таком виде каталитическую активность. Сам термин «иммобилизованные ферменты» узаконен в 1971 г. и означает любое ограничение свободы передвижения белковых молекул в пространстве.

*Преимущества иммобилизованных ферментов перед нативными предшественниками:*

1. Гетерогенный катализатор легко отделим от реакционной среды, что дает возможность остановить реакцию в любой момент, использовать фермент повторно, а также получать чистый от фермента продукт.

2. Ферментативный процесс с использованием иммобилизованных ферментов можно проводить непрерывно, регулируя скорость катализируемой реакции и выход продукта.

3. Модификация фермента целенаправленно изменяет его свойства, такие как специфичность (особенно в отношении макромолекулярного субстрата), зависимость каталитической активности от рН, ионного состава и других параметров среды, стабильность к денатурирующим воздействиям.

4. Можно регулировать каталитическую активность иммобилизованных ферментов путем изменения свойств носителя действием физических факторов, таких как свет и звук. Иммобилизовать ферменты можно как путем связывания на нерастворимых носителях, так и путем внутримолекулярной или межмолекулярной сшивки белковых молекул низкомолекулярными бифункциональными соединениями, а также путем присоединения к растворимому полимеру.

Для получения иммобилизованных ферментов используется огромное число носителей, как органических, так и неорганических.

*Требования, предъявляемые к носителям:*

- высокая химическая и биологическая стойкость;
- высокая механическая прочность;
- достаточная проницаемость для фермента и субстратов, большая удельная поверхность, высокая вместительность, пористость;
- возможность получения в виде удобных в технологическом отношении форм (гранул, мембран, труб, листов и т.д.);
- легкое переключение в реакционноспособную форму (активация);
- высокая гидрофильность, обеспечивающая возможность проведения реакции связывания фермента с носителями в водной среде;
- невысокая стоимость.

## **Типы носителей**

### ***1. Полимерные органические носители:***

*а) Природные полимерные носители:* полисахариды (целлюлоза, декстран, агароза и их производные), коллаген, белки.

Для иммобилизации ферментов наиболее широко используются природные полисахариды и синтетические носители полиметильного типа, остальные применяются значительно реже. Большое значение природных полимеров в качестве носителей для иммобилизации объясняется их доступностью и наличием реакционноспособных функциональных групп, легко вступающих в химические реакции. Характерной особенностью этой группы носителей также является их высокая гидрофильность. Недостаток природных полимеров – неустойчивость к воздействию микроорганизмов и довольно высокая стоимость.

Целлюлоза представляет собой поли-1,4-β-D-глюкопиранозил-D-глюкопиранозу:

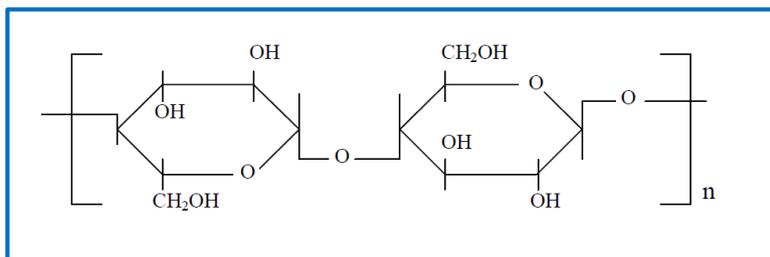
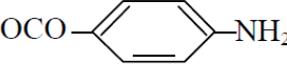
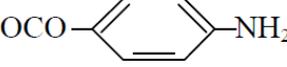
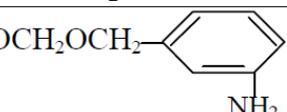
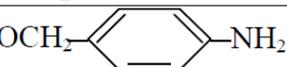


Таблица 7

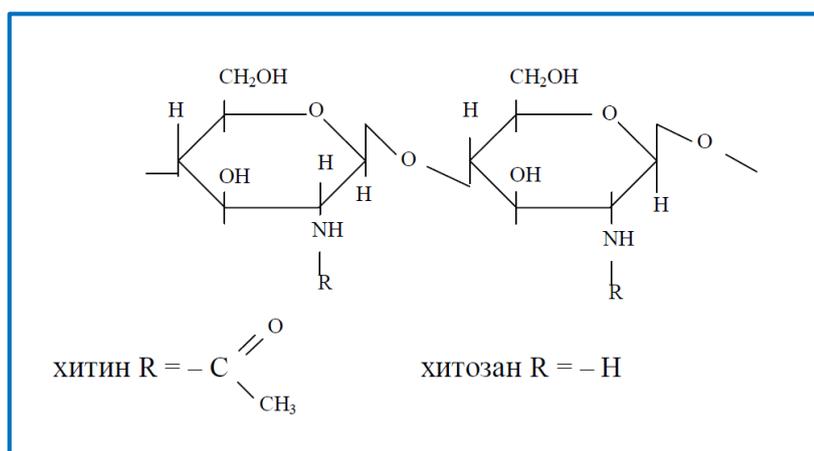
### Целлюлоза и некоторые ее производные

Заместитель по OH-группе	Название препарата	Фирма
–	Целлюлоза	«Whatman» (Англия)
O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	Аминоэтилцеллюлоза	То же
OPO <sub>3</sub> H	Фосфорилцеллюлоза (P-10)	То же
–	Целлюлоза	«Sigma» (США)
–	Целлюлоза	«Bio-Rad-Labs» (США)
O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	Диэтиламиноэтилцеллюлоза	То же
OCH <sub>2</sub> COOH	Карбоксиметилцеллюлоза	То же
O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	Аминоэтилцеллюлоза	То же
OSO— 	p-Аминобензоилцеллюлоза	То же
OSO— 	m-Аминобензоилцеллюлоза	«Serva» (Германия) «Reanal» (Венгрия)
OSOCH <sub>2</sub> Br	Бромацетилцеллюлоза	То же
$\left\{ \begin{array}{l} O(CH_2)_2N(C_2H_5)_2 \\ OSO— \end{array} \right.$	Бензоилдиэтиламиноэтилцеллюлоза	То же
OCH <sub>2</sub> CONHNH <sub>2</sub>	Гидразидкарбоксиметилцеллюлоза	«Miles Labs» (Англия)
OSOCH <sub>2</sub> Br	Бромацетилцеллюлоза	То же
OCH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> — 	m-Аминобензилоксиметилцеллюлоза	То же
O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	ДЭАЭ-целлюлоза	НПО «Биохимреактив»
OCH <sub>2</sub> COOH	КМ-целлюлоза	То же
OCH <sub>2</sub> — 	p-Аминобензилцеллюлоза	То же
O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> H	Триэтиламмонийэтилцеллюлоза	То же
O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N <sup>+</sup> (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>3</sub>	Сульфэтилцеллюлоза	То же

Целлюлоза отличается высокой степенью гидрофильности, а наличие большого количества гидроксильных групп дает возможность ее легко модифицировать путем введения различных заместителей. Препараты целлюлозы для придания им химической устойчивости «сшивают» эпихлоргидрином.

Для увеличения механической прочности целлюлозу гранулируют путем частичного гидролиза, в результате которого разрушаются ее аморфные участки. На их место для сохранения прочности между кристаллическими участками вводят химические сшивки. Гранулированная целлюлоза благодаря простоте получения, сравнительно низкой стоимости относится к удобным носителям для иммобилизации ферментов. К недостаткам целлюлозы как носителя можно отнести ее неустойчивость к воздействию сильных кислот, щелочей и окислителей. Гранулированную целлюлозу довольно легко превращают в различные ионообменные производные, которые имеют промышленное значение

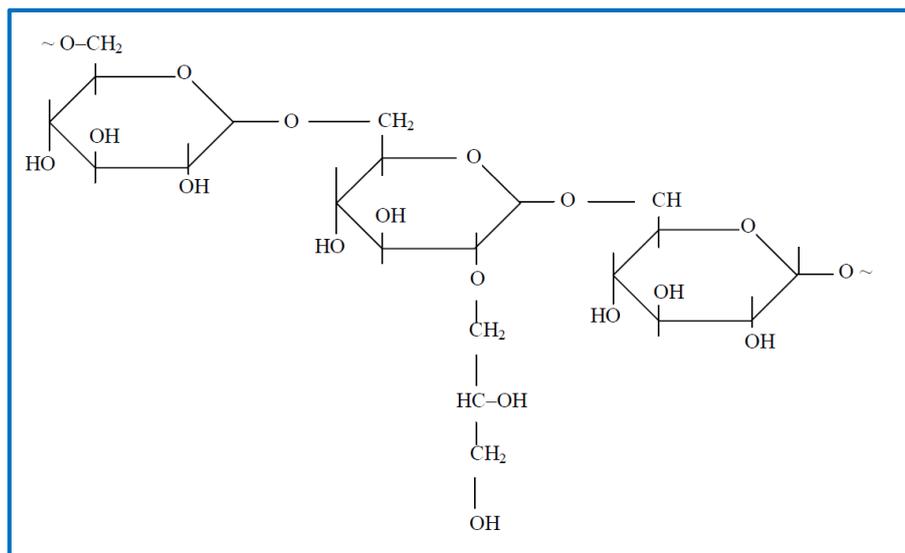
**Хитин** – природный аминсахарид, у которого группа  $\text{CH}_2\text{OH}$  замещена на ацетоамидный остаток.



**Хитин** – основной компонент наружного скелета ракообразных, насекомых, а также клеточных оболочек некоторых грибов. Это соединение является отходом промышленной переработки креветок и крабов, поэтому доступно в больших количествах

при относительно низкой стоимости. Хитин обладает пористой структурой, не растворяется в воде, разбавленных кислотах и щелочах, а также в органических растворителях. Для перевода в реакционноспособную форму он может быть модифицирован глутаровым альдегидом, а также солями тяжелых металлов. Обработка хитина концентрированными растворами щелочей (деацелирование) приводит к образованию хитозана. **Хитозан** имеет свободные аминогруппы, поэтому может использоваться для ковалентной иммобилизации с помощью бифункциональных реагентов: диальдегиды, диизоцианаты. В отличие от хитина хитозан растворяется в минеральных и органических кислотах, поэтому для иммобилизации он часто применяется в виде растворов (рН 3–7). Полученные препараты иммобилизованных ферментов и других биобъектов на основе хитозана обладают высокой каталитической активностью и устойчивостью к микробному воздействию; наблюдается и повышение термостабильности белков, иммобилизованных на хитозане.

## Декстран – поли-1,6- $\alpha$ -D-глюкопиранозил-D-глюкопираноза – раз-



ветвленный полисахарид из бактериальных источников, содержащий остатки глюкозы, связанные, в основном, 1,6-глюкозид-ными связями (а также 1,2-, 1,3- и 1,4- связями):

Фирмы

«Pharmacia» и «Renal» выпускают ряд производных декстрана, содержащих различные функциональные группы

водных декстрана, содержащих различные функциональные группы

Таблица 8

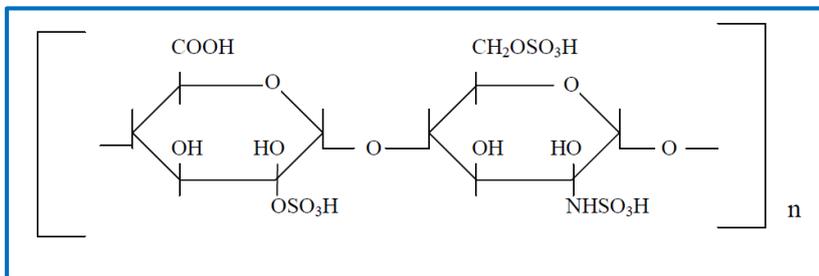
### Коммерческие препараты производных декстрана

Функциональная группа	Название и марка	Фирма
$\text{OCH}_2\text{COOH}$	Карбоксиметилсефадекс (CM)	«Pharmacia» (Швеция)
$\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{H}$	Сульфопропилсефадекс (SP)	То же
$\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Диэтиламиноэтилсефадекс (DEAE)	То же
$\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{CH}_2\text{-CH}(\text{OH})\text{CH}_3$	Диэтил-(2-оксипропил)аминоэтилсефадекс (QAE)	То же
$\text{OCH}_2\text{COOH}$	Молселект (CM)	«Renal» (Венгрия)
$\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$	Молселект (SE)	То же
$\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Молселект (DEAE)	То же

Широко распространены носители на основе декстрана, выпускаемые под названием «сефадексы». При высушивании они легко сжимаются, в водном растворе сильно набухают. В этих носителях размер пор в геле регулируется степенью сшитости. К группе декстранов относят и крахмал. Химически модифицированный крахмал сшивается агентами, такими как формальдегид. Таким способом был получен губчатый крахмал, обладающий повышенной устойчивостью по отношению к ферментам, гидролизу. Водорастворимые препараты на основе декстрана часто применяются как носители лекарственных средств в медицине.

Хорошим носителем считается агар. Его свойства улучшаются после химической сшивки, например, диэпоксидными соединениями. Такой агар становится устойчивым к нагреванию, прочен, легко модифицируется.

**Гепарин** представляет собой кислый полисахарид, содержащий чередующие звенья сульфатированной *D*-глюкуроновой кислоты (или *L*-идурановой)



и сульфатированного глюкозамина (или *N*-ацетилглюкозамина).

Гепарин успешно применяется для получения водорастворимых

препаратов иммобилизованных ферментов, используемых в медицине для введения *in vivo*.

**Белки** в качестве носителей обладают рядом достоинств: вместительны, способны к биодegradации, могут применяться в качестве тонкой (толщиной 80 мкм) мембраны. Иммобилизацию ферментов на белковых носителях можно проводить как в отсутствие, так и в присутствии сшивающих агентов. Белки используются и в фундаментальных биологических исследованиях, и в медицине. К недостаткам белков в качестве носителей относят их высокую иммуногенность (за исключением коллагена и фибрина). Наиболее для иммобилизации используются структурные (кератин, фибрин, коллаген), двигательные (миозин) и транспортные (альбумин) белки.

*б) Синтетические полимерные носители:*

- полимеры на основе стирола;
- полимеры на основе производных акриловой кислоты: акриламид, полиакриламидный ген (ПААГ), хлорангидрид метакриловой кислоты;
- полиамидные носители: найлон-6, капрон, *N*-винил-пирролидон;
- полимеры на основе поливинилового спирта;
- полиуретаны.

Синтетические полимерные носители применяются для ковалентной и сорбционной иммобилизации ферментов, для получения гелей, микрокапсул. Полимеры на основе стирола применяются сорбционной иммобилизации. Они могут иметь макропористую, изопористую структуру, а также гетеропористую структуру. Для получения полимерных гидрофильных носителей широко используется акриламид – производное акриловой кислоты.

Активация полимерных носителей – проведение химических реакций с активатором, в результате которой на её поверхности образуются электрофильные группы, обладающие высокой реакционной способностью по отношению к нуклеофильным группам на белке (например, к amino- и SH-группам).

## **2. Органические низкомолекулярные носители:**

### *а) природные носители (липиды)*

*In vivo* большинство ферментативных реакций протекает вблизи или на поверхности биомембран. Поэтому иммобилизация ферментов на природных липидных носителях (белок – липид) может рассматриваться как наиболее близкое приближение к условиям функционирования ферментативных систем в живой клетке. Используются природные липиды – компоненты биомембран. Применяются в виде монослоев на различных поверхностях или бислоев (сферические формы).

### *б) синтетические аналоги липидов (ПАВ)*

## **3. Неорганические материалы – носители:**

Могут быть как пористые, так и непористые:

а) макропористые кремнеземы (силикагели, силохромы, макропористые стекла);

б) природные алюмосиликаты, пористая керамика, уголь, графитовая сажа, карбохром (отложение угля на гранулированной саже), металлы, их оксиды.

## **Методы физической иммобилизации ферментов**

*Иммобилизация фермента* – включение в какую-либо изолированную фазу, которая отделена от фазы свободного раствора, но способна обмениваться с находящимися в последней молекулами субстрата или эффектора. Иными словами, иммобилизация представляет собой включение фермента в такую среду, в которой для него доступной является лишь ограниченная часть общего объема.

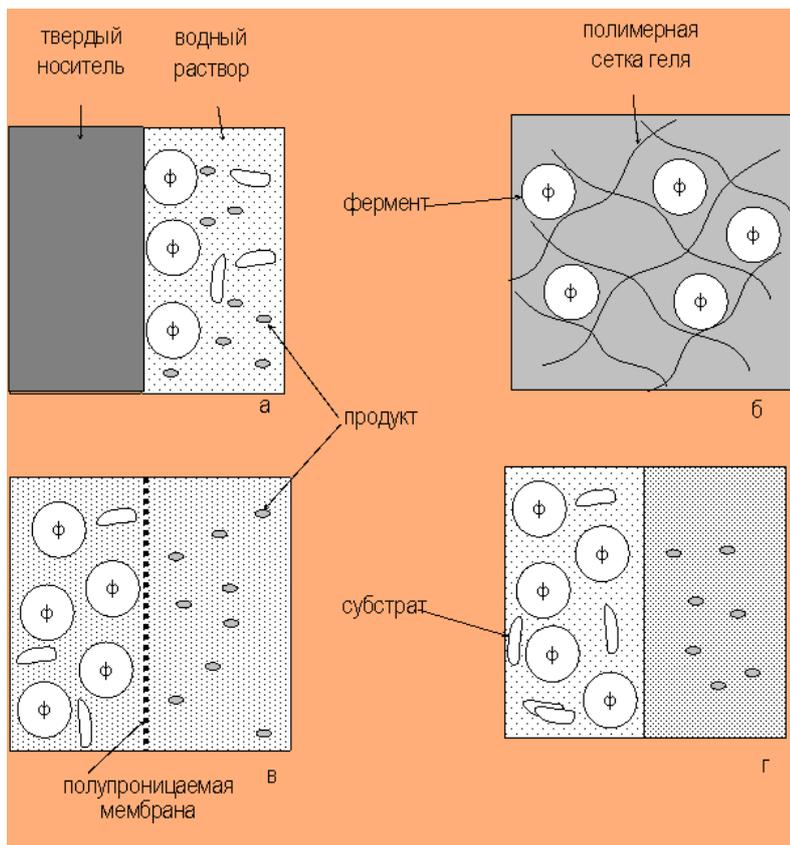
Все методы физической иммобилизации (т.е. иммобилизации, при которой фермент не соединен с носителем ковалентными связями) разделяют на четыре группы:

1. **Адсорбция на нерастворимых носителях** (т.е. на поверхности носителя). Этот метод отличается исключительной простотой, которая достигается при контакте водного раствора фермента с носителем. После отмывки неадсорбирующегося фермента препарат иммобилизуется, биокатализатор готов к использованию.

2. **Включение в поры геля.** Молекулы фермента включаются в трехмерную сетку из тесно переплетенных полимерных цепей, образующих гель. Среднее расстояние между соседними цепями меньше размера молекулы включенного фермента, поэтому он не может покинуть полимерную матрицу и выйти в окружающий раствор. Метод отличается простотой применения, иммобилизация препятствий, возможность создания любой формы (сферы, пленки), равномерность биокатализатора в объеме реактора, защищенность фермента.

3. **Иммобилизация в полимерных пленках (мембранах).** Водный раствор отделяется от одного раствора субстрата полупроницаемой мембраной, которая легко пропускает небольшие молекулы субстрата, но представляет собой неопределенный барьер для крупных молекул фермента. Особенность метода заключается в невозможности ферментативного превращения высокомолекулярных субстратов.

4. **Включение в двухфазную реакционную среду,** где препарат может



находиться только в одной из фаз. Ограничение свободы передвижения фермента в объеме системы достигается не за счет его взаимодействия с жесткими носителями (адсорбентом, гелем или мембраной), а за счет его способности растворяться только в одной из фаз системы. Отличается низкой скоростью процесса, из-за небольшой площади поверхности раздела фаз.

Адсорбционная иммобилизация является наиболее старым из всех существующих способов. Еще в 1916 г.

Нельсон и Гриффин провели успешную иммобилизацию инвертазы путем адсорбции на активированном угле и геле гидроксида алюминия. Адсорбционная иммобилизация клеток, в частности микроорганизмов, основывается часто на способности многих из них прикрепляться к разнообразным твердым или гелеобразным носителям и продолжать жизнедеятельность в таком состоянии (микробные популяции почвы, кишечника, рубца, некоторые азотфиксирующие микроорганизмы растений и т.д.). Поверхность клеток неоднородна, характеризуется мозаичной структурой – наличием гидрофильных и гидрофобных участков. Разнообразие свойств поверхности клеток и адсорбентов определяют различные механизмы адсорбционного взаимодействия (ион – ионные взаимодействия, ван-дер-ваальсовы силы и т.д.). Однако указанные подходы к классификации способов иммобилизации оставляют в стороне проблему микроокружение препарата.

Поэтому предлагается использовать следующую классификацию:

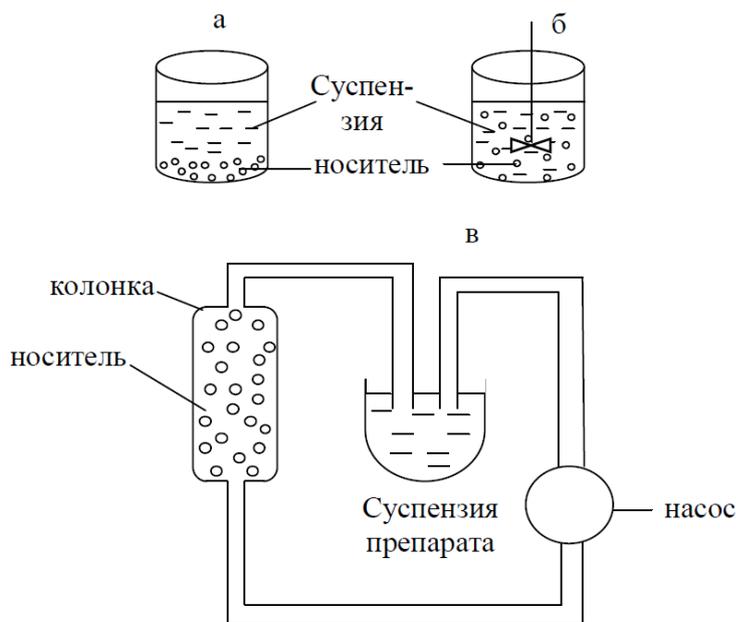
1. **Иммобилизация на носителе или на поверхности носителя.** В этом случае удерживающая поверхность или часть поверхности носителя «омывается» внешней средой (жидкой или газообразной).

2. **Иммобилизация в носителе или в массе (объеме) носителя.** Между внешней средой и препаратом в результате иммобилизации появляется слой материала носителя. В данном случае свойства носителя (например, пористость, заряд, гидрофильность) в значительной степени могут сказываться на функционировании иммобилизованного препарата и на уровне реализации потенциальных возможностей.

3. Следующий вариант называют **иммобилизацией с использованием мембранной технологии.** Препарат и небольшая часть внешней среды помещены в замкнутый объем, отделенный от остальной среды избирательно проницаемой мембраной, размер пор, в которой таковы, что субстраты и продукты через них проникают, а иммобилизованный препарат удерживается внутри замкнутого объема.

#### ***Иммобилизация на поверхности носителя.***

Для осуществления данного подхода к созданию иммобилизованных систем используются разные носители: непористые, ячеистые и др. При иммобилизации на носителе препарат может быть связан различными силами: адсорбционно неспецифически – взаимодействие базируется на не ковалентных контактах (ионные, гидрофобные, водородные и др.); адсорбционно биоспецифически – носитель, содержащий аффинные лиганды, способен образовать достаточно прочные комплексы с поверхностью препарата (в основе также лежат нековалентные взаимодействия); химически удерживающая матрица должна иметь особые группировки, способные реагировать с компонентами препарата (этот случай можно рассматривать как хемосорбцию); либо для ковалентного связывания препарата с носителем необходим специальный сшивающий агент. К достоинствам адсорбционной иммобилизации относятся исключительная простота методов ее проведения. По существу, иммобилизация происходит при контакте водной суспензии биопрепаратов с адсорбентом (исключение составляет иммобилизация с помощью электроадсорбции). Способы разделяются на статические, с перемешиванием и путем нанесения на колонке.



Способы адсорбционной иммобилизации:  
 а – статический; б – с перемешиванием;  
 в – нанесения в колонке

процесса адсорбции и более равномерное заполнение носителя. Способ нанесения в колонке заключается в прокачивании суспензии с препаратом через колонку, заполненную носителем. Иногда для проведения адсорбционной иммобилизации применяют *метод электроосаждения (электроадсорбция)*. В этом случае в раствор препарата погружают два электрода, на поверхность одного из которых помещают слой носителя. При пропускании электрического тока молекулы фермента или клетки благодаря имеющимся на



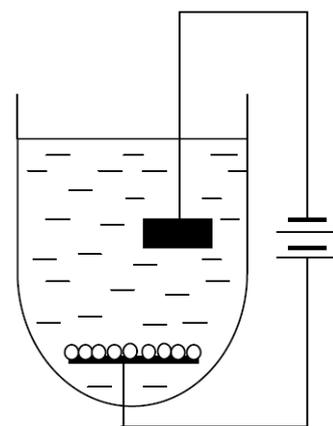
поверхности заряженным группам начинают перемещаться в растворе в направлении электрода с носителем и осаждаются на поверхности последнего.

### **Иммобилизация в массе носителя**

Этот вариант один из самых распространенных, хотя его нельзя отнести к самым простым подходам. В данном варианте иммобилизации в качестве носителей применяются либо полимерный гель, либо полимерное волокно. Нерастворимые материалы, которые служат основой матриц подобных носителей, могут быть как органическими веществами, так и неорганическими соединениями, как синтетическими производными, так и природными продуктами. Если говорить о природе сил, удерживающих препарат в объеме носителя, то и здесь может быть, как обездвиживание за счет физических факторов

Статический способ наиболее прост и заключается в том, что носитель (адсорбент) вносят в суспензию биопрепарата и смесь некоторое время инкубируют. Иммобилизация достигается за счет осаждения клеток и последующей их адсорбции на частицах носителя. Недостатком способа является необходимость длительного контакта адсорбента с суспензией биопрепарата.

Способ с перемешиванием обеспечивает более быстрое завершение

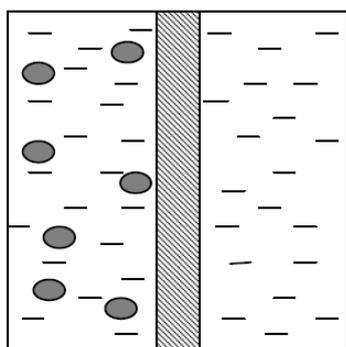


Иммобилизация методом электроосаждения

(просто массой носителя, т.е. механически), так и фиксация с образованием ковалентных связей между компонентами препарата и веществом матрицы (препарат «вшивается» в носитель). Широкое распространение метода обусловлено тем, что в этом варианте достигается более высокая удельная концентрация иммобилизованных препаратов в носителе. Это в свою очередь теоретически дает возможность поднять продуктивность биотехнологического процесса в целом. Еще одно важное преимущество иммобилизации в носителе по сравнению с иммобилизацией на носителе состоит в хороших эксплуатационных свойствах получаемых препаратов. Препараты также лучше защищены от многих неблагоприятных факторов среды.

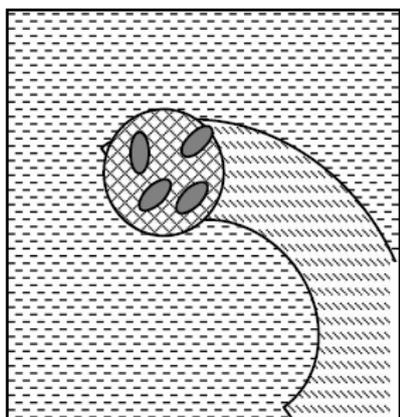
### ***Иммобилизация с использованием мембранной технологии***

Суть метода – водный раствор препарата отделяется от водного раствора субстрата избирательно проницаемой мембраной. Существующие модификации этого метода различаются лишь способами получения избирательно проницаемой мембраны и ее природой. Важным фактором является толщина мембраны – с ее уменьшением происходит повышение проявляемой иммобилизованными биокатализаторами активности, что определяется возможностью увеличения диффузии субстрата к биокатализатору. Наиболее широкое распространение мембранные биокатализаторы получили не в системах превращения веществ, а при создании чувствительных элементов биосенсоров. носитель препарат внешняя среда. В мембранной технологии применяются следующие системы: плоские мембраны, пористые волокна и микрокапсулы. *Плоские мембраны* – легко пропускают молекулы субстрата, но представляют собой непреодолимый барьер для крупных молекул фермента или клеток.



**Иммобилизация с использованием мембранной технологии**

Плоские мембраны – легко пропускают молекулы субстрата, но представляют собой непреодолимый барьер для крупных молекул фермента или клеток.



**Иммобилизация в пористые волокна**

*Пористые волокна* – аналогично случаю плоских мембранных носителей, только здесь используются мембранные полые волокна. Фактически эти волокна представляют собой длинные тонкие трубки, стенки которых выполнены из полимерной мембраны. По сравнению с плоскими мембранами отношение занимаемого препаратами объема к общему объему системы выше, поэтому и выше получаются удельные продуктивности. Среди волокнообразующих полимеров используются триацетат целлюлозы – дешевый и доступный носитель, а также волокна коагулята целлюлозы. Носитель из коагулята целлюлозы

гидрофилен, обладает высокой механической прочностью, его химическая и биологическая устойчивость определяется стабильностью самой целлюлозы.

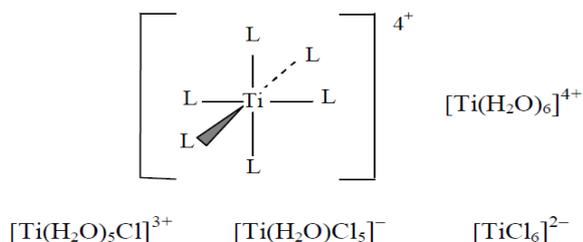
### **Микрокапсулирование**

Суть метода в том, что водный раствор с биопрепаратом (фермент, клетка) включают внутрь микрокапсул, представляющих собой замкнутые сферические пузырьки с тонкой полимерной стенкой (мембраной). В зависимости от условий получения размер микрокапсул изменяется от нескольких десятков до нескольких сотен микрометров. Для формирования микрокапсул с иммобилизованными препаратами существуют два основных подхода: диспергирование и (микро) гранулирование. В первом случае водная суспензия клеток диспергируется в несмешивающуюся с ней органическую жидкость, а присутствующие в системе специальные добавки образуют на поверхности капелек водной фазы мембранную пленку. Получаемые микрокапсулы имеют неодинаковые размеры – существует некоторое распределение величин их диаметров, зависящее от гидродинамических свойств применяемых жидкостей, интенсивности перемешивания, соотношения объемов фаз, геометрии рабочего сосуда и конструкции мешалки. Во втором случае водная суспензия препарата через особое дозирующее устройство (гранулятор) инъецируется порциями строго заданного объема в несмешивающуюся с водой органическую жидкость, где на границе раздела фаз поверхности водной капли происходит формирование оболочки микрокапсулы. В этом случае получаются частицы практически одинаковой величины. В принципе, микрокапсулирование отличается от включения в волокна, главным образом, формой получаемых препаратов: при микрокапсулировании образуются сферические микрокапсулы, а при втором способе – нити. Технология микрокапсулирования в настоящее время находит очень широкое применение в самых разнообразных отраслях – от производства лекарств и пищевых добавок до изготовления красящего слоя печатающих устройств или специальных антипиреновых присадок к полимерным композициям. Большие надежды связываются с практической реализацией лазерного термоядерного синтеза, где используют шарики дейтериево-тритиевого топлива, включенные как раз в микрокапсулы. Определенное развитие получили методы иммобилизации ферментов в полимерные микрокапсулы, а также довольно популярны эти приемы при иммобилизации животных и растительных клеток; что касается микроорганизмов, то таких работ еще мало. Наполнение микрокапсул (внутреннее содержимое) может быть газовым, жидким, студнеобразным и твердым. Весьма интересен прием совместного капсулирования клеток и экзогенных ферментов. Например, бактерии *Glucanobacter oxydans*, способные окислять глюкозу в глюконовую кислоту, требуют для этого хорошего снабжения кислородом. Однако при капсулировании даже при обильной аэрации они проявляли низкую

глюкозооксидазную активность. При включении в полимер одновременно с клетками каталазы и добавлении в среду  $\text{H}_2\text{O}_2$  (донор кислорода) количество образующейся глюконовой кислоты резко увеличилась.

### Иммобилизация металлохелатным способом

Для целей иммобилизации, как оказалось, можно использовать свойства ряда металлов образовывать хелатные комплексы. В этом случае не требуется



#### Пример комплексного иона

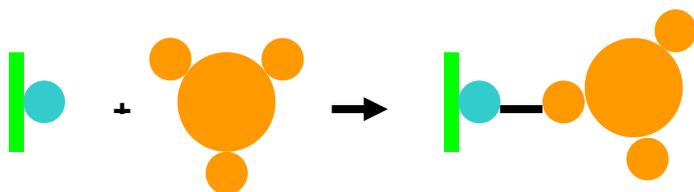
дополнительной модификации носителя, и иммобилизация протекает быстро и в достаточно обычных условиях. Наиболее подходящими свойствами для иммобилизации обладают из переходных металлов титан и цирконий, оксиды которых не проявляют токсического действия. Этот метод иммобилизации разработан для ферментов на основе химии гидроксидов переходных металлов. В качестве носителя используют собственно гидроксид металла, который можно получить осаждением при гидролизе соответствующего хлорида. Молекула фермента иммобилизуется при образовании хелатов. При некоторых приемах используется совместное осаждение гидроксидов металлов с ферментами. Такое осаждение может привести к получению более активного продукта, чем при последующем добавлении фермента, так как поверхность частицы выпадающего в осадок гидроксида очень велика. Металлохелатный метод иммобилизации ферментов впервые разработал Новеис в университете г. Бирменген (Великобритания) в опытах иммобилизации на целлюлозе с применением диазотирования.

Рассмотрим возможность переходных металлов образовывать хелатные комплексы с биополимерами на примере титана и целлюлозы. В растворе хлорида титана определенная часть ионов титана образует октаэдрические координационные комплексы с другими молекулами и ионами, которые в данном случае выступают в роли лигандов комплексного иона.

### Химические методы иммобилизации ферментов

Главным отличительным признаком химических методов иммобилизации является то, что путем химического взаимодействия на структуру фермента в его молекуле создаются новые ковалентные связи, в частности между белком и носителем. Препараты иммобилизованных ферментов, полученные с применением химических методов, обладают по крайней мере, двумя важными достоинствами. Во-первых, ковалентная связь фермента с носителем обеспечивает высокую прочность образующегося конъюгата. При широком варьировании таких условий, как pH и температура, фермент не десорбируется с носителя и не

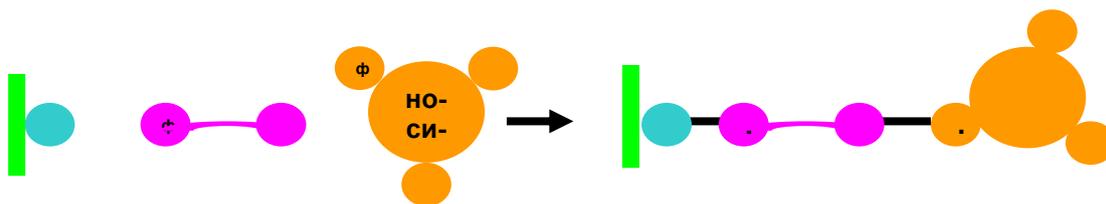
загрязняет целевых продуктов катализируемой им реакции. Это особенно важно при реализации процессов медицинского и пищевого назначения, а также для обеспечения устойчивых, воспроизводимых результатов в аналитических системах. Во-вторых, химическая модификация ферментов способна приводить к существенным изменениям их свойств, таких как субстратная специфичность, каталитическая активность и стабильность. Химическая иммобилизация ферментов является искусством, уровень которого определяется, в первую очередь, умением экспериментатора. Основная задача экспериментатора заключается в формировании новых ковалентных связей в молекуле фермента при использовании его функциональных групп, несущественных для проявления его каталитической активности. При химической модификации фермента его активный центр желательно защищать. При сопоставлении различных приемов иммобилизации химические методы для крупномасштабных биотехнологических процессов кажутся малопривлекательными из-за сложности и дороговизны. В промышленных процессах обычно используются те или иные методы физической иммобилизации.



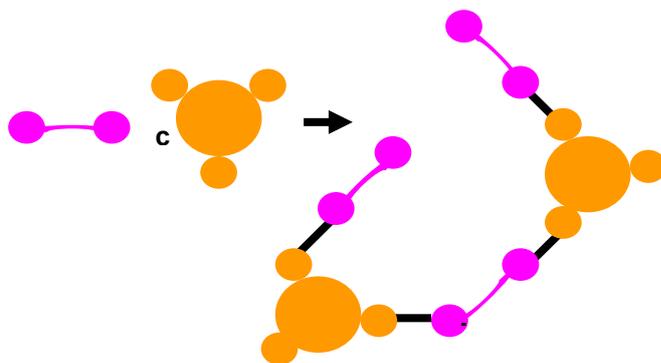
а) В раствор фермента вводится носитель и фермент на нем адсорбируется, однако при химической иммобилизации процесс необратим – фермент пришивается

к носителю одной или несколькими ковалентными связями. Тесный контакт белка с носителем может быть неблагоприятным, из-за нежелательного изменения микросреды фермента, стерических и диффузионных ограничений.

б) Сшивка фермента с носителем посредством сшивающего агента.



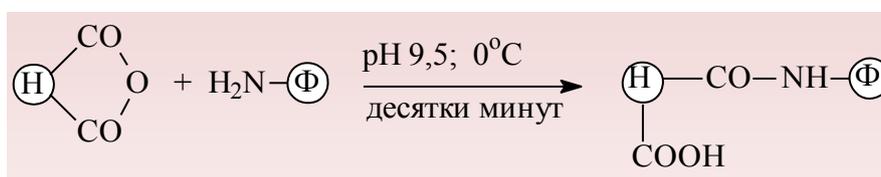
в) конструирование ферментативных сеток (ретикуляция ферментов).



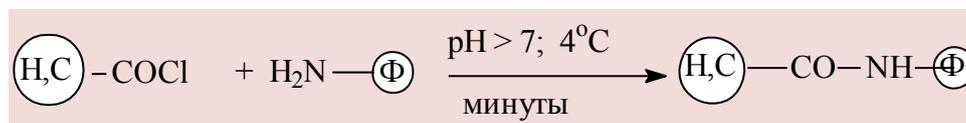
Носитель (как твердое тело) формируется непосредственно в процессе иммобилизации или же сам фермент служит одновременно и носителем.

**Приемы химической (ковалентной) иммобилизации фермента**

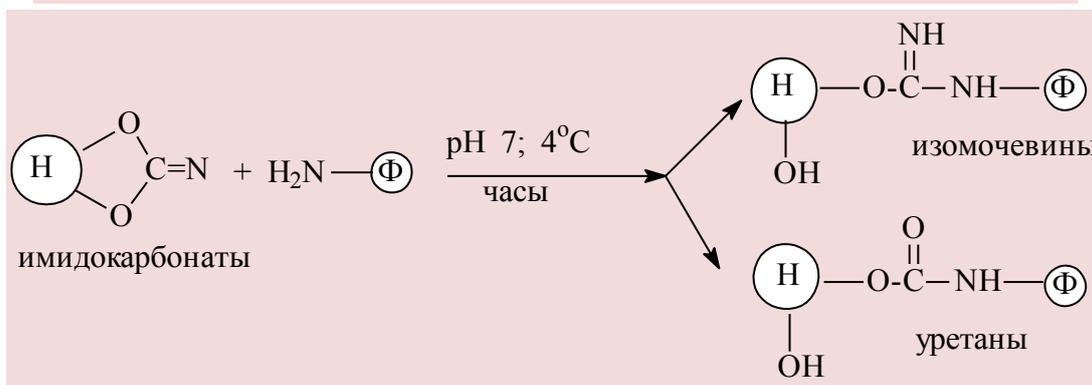
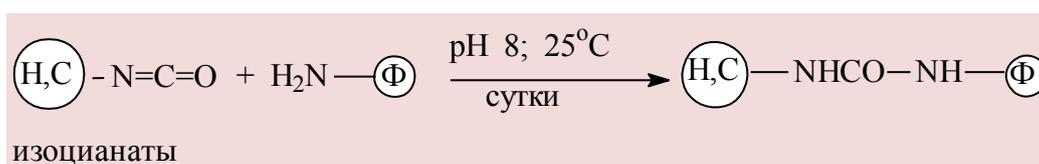
а) образование амидной связи [-C(O)-NH-]



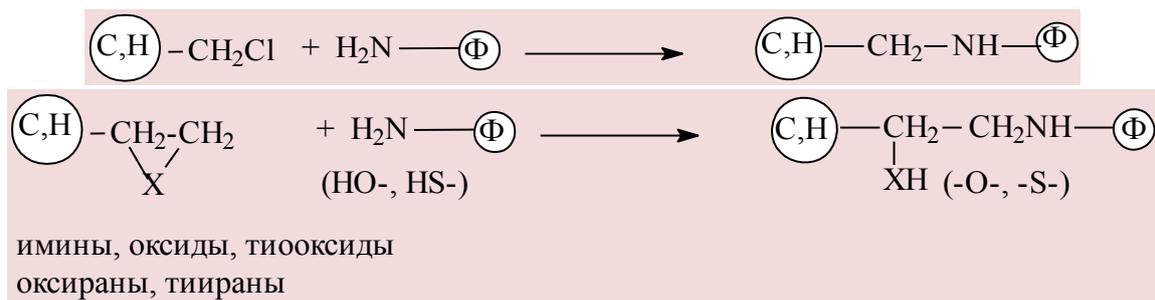
ацилирование аминогрупп фермента



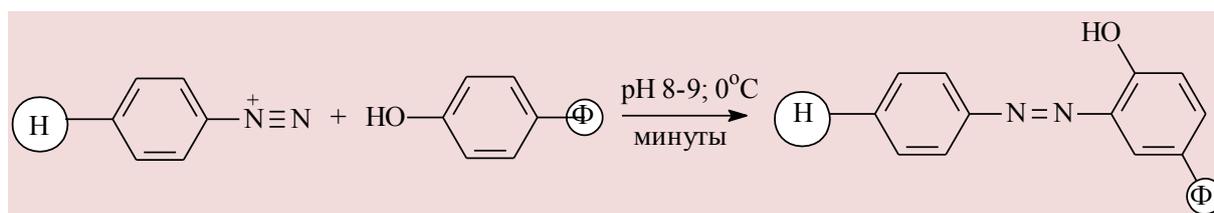
б) образование карбамидных связей (производство мочевины – (NH-C(O, S)-NH-))



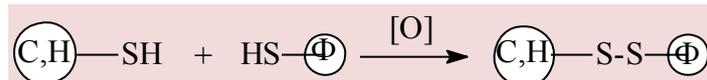
в) образование вторичных аминов (связи –NH–)



г) азосочетание (-N=N-), основная группа-мишень в белке – фенольная группа тирозина.



д) тиол-сульфидный обмен (-S-S) – формирование межмолекулярных дисульфидных связей.



е) радикальные реакции (графт-сополимеризация).

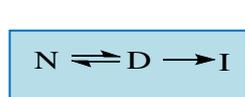
Химическая прививка – рекомбинация макрорадикалов при воздействии мощного источника  $\gamma$  – излучения.

### Стабильность иммобилизованных ферментов

Небольшого отклонения от нормы (внешних условий) может оказаться достаточным, чтобы нарушить структуру и функцию фермента, т.е. инактивировать их.

Инактивный процесс – двустадийный:

1 стадия – обратимое конформационное изменение.



N – нативная форма

D – обратимо денатурированное

I – необратимо денатурированное

**I. Агрегация белка** – при длительной инкубации концентрация белка в растворе при повышенной температуре, pH экстремальных, за счет слабых нековалентных взаимодействий (гидрофобные водородные связи), если есть –SH, то дисульфидные мостики S-S связи.

Все химические процессы, приводящие к инактивации белка, можно подразделять на две группы: разрыв полипептидной цепочки и химическая модификация отдельных функциональных групп белка, т.е. происходит изменение первичной структуры (гидролиз пептидной связи и автолиз). Результат работы

протеаз, окисление функциональных групп ферментов (при повышении температур, окисляется SH – группа цистеина, индольные фрагменты триптофана).

## ***II. Гидролиз пептидных связей***

Чтобы создать очень жесткие условия, необходимо многочасовое кипячение в концентрированной соляной кислоте (на отдельные аминокислоты) или слабощелочной гидролиз при  $T=80-100^{\circ}\text{C}$ , гидролиз незначительный или не происходит.

*Протеолиз.* Гидролиз проходит при комнатной температуре, нейтральном значении pH, под действием протеаз – ферментов для деградации других белков в мягких условиях. Возможности – в качестве примесей сопутствующих, бактериальное заражение реакторов, случайные клетки микроорганизмов секретируют протеазы, которые расщепляют фермент-биокатализатор в реакторе. «Осколками» фермента микроорганизмы питаются, размножаются, то есть засоряют реактор и инактивируют биокатализатор (уменьшают активность фермента).

*Автолиз* – сами протеолитические ферменты способны расщеплять молекулы не только других белков и себе подобные.

*Окисление функциональных групп фермента:*

При повышении температуры: окисляются SH группы в цистеине и индольные фрагменты триптофана – модифицирующие производные аминокислот (SOH, SO<sub>2</sub>H и др.).

*Расщепление S-S-связей в белках:*

- восстанавливающая среда (тиолы, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>);
- щелочная среда при повышении температуры.

*Химическая модификация участвующих в катализе SH группы.* «Отравление» белков катионами тяжелыми металлами: Hg, Pb, Cu и другие – меркантиды.

*Радиационная инактивация ферментов.*

## ***III. Десорбция кофактора из активного центра фермента***

Известен большой класс ферментов, в состав активных центров входят атомы металлов, металлосерные кластеры и другие нековалентно связанные простетические группы (кофакторы). Сдвиг равновесия между связанных с белком и свободными формами.

## ***IV. Диссоциация олигомерных белков на субъединицы***

Под действием денатурантов (мочевины, кислот, нагревании), обратимый процесс, если нет конформационных изменений в отдельных субъединицах.

## ***V. Сорбция белка на стенках реакционного сосуда***

Зависит от материала, из которого изготовлен реактор, становится заметной в разбавленных белковых растворах ( $10^{-8}$ - $10^{-10}$  моль/л).

## ***VI. Инактивация в потоке.***

В проточных реакторах происходит механическая деформация белковых молекул.

## ***VII. Необратимые конформационные изменения (необратимая денатурация)***

Разрушение «правильных» нековалентных взаимодействий, которые поддерживают нативную структуру и образуются «ненативные» нековалентных взаимодействий, выгодные при повышенной температуре, при охлаждении эти «неправильные» нековалентные взаимодействия сохраняются по чисто кинетическим причинам, поскольку молекулярная подвижность существенно уменьшается при понижении температуры. Белок не может самопроизвольно ренатурировать, т.е. перейти в нативную форму.

Применение иммобилизованных ферментов:

- ферментативное превращение целлюлозы в сахара;
- в микроанализе;
- биоэлектроанализ;
- в медицине;
- получение глюкозо-фруктоз сиропов и т.д.

### **Иммобилизованные клетки микроорганизмов**

В 70-х гг. XX в. появились первые публикации об иммобилизации клеток микроорганизмов, а первое промышленное применение иммобилизованных клеток было осуществлено в Японии в 1974 г. С их помощью получали аспарагиновую кислоту.

Иммобилизованные клетки имеют ряд преимуществ как перед иммобилизованными ферментами, так и перед свободными клетками:

- отсутствие затрат на выделение и очистку ферментов;
- снижение затрат на выделение и очистку продуктов реакции;
- более высокая активность и стабильность;
- возможность создания непрерывных и полунепрерывных автоматизированных процессов;
- способность к длительному функционированию полиферментных систем без экзогенных кофакторов.

Для иммобилизации могут быть использованы клетки в различном состоянии: живые и поврежденные в различной степени. Одностадийные реакции могут осуществлять и живые, и поврежденные клетки. Полиферментные реакции проводят с применением живых клеток, которые могут длительное время регенерировать АТФ и коферменты (НАДФ, НАД).

Проблема использования ферментативной активности иммобилизованных микроорганизмов имеет глубокие корни. Более 150 лет назад быстрый способ получения уксуса был основан на применении микроорганизмов, адсорби-

рованных на древесной стружке. Методы иммобилизации клеток схожи с методами иммобилизации ферментов.

Химический метод основан на образовании ковалентных связей с активированным носителем, на поперечной сшивке клеток за счет активных групп в клеточной оболочке с бифункциональными реагентами (например, глутаровым альдегидом)

К физическим методам относятся адсорбция и агрегация.

Иммобилизация клеток путем включения в различные гели, мембраны, волокна основана на химических и физических взаимодействиях. Химические методы используются реже по сравнению с другими методами и малопригодны для иммобилизации живых клеток. Гораздо большее распространение получило включение клеток в состав гелей, мембран и волокон. При таком способе иммобилизации клетки могут сохранять жизнеспособность и в присутствии питательной среды размножаться в приповерхностных слоях гелей.

Биокаталитическая активность целых иммобилизованных клеток в настоящее время может быть использована в различных отраслях науки и техники:

- при биосинтезе и трансформации таких соединений, как аминокислоты, органические кислоты, антибиотики, стероиды углеводов, углеводороды, нуклеотиды и нуклеозиды;
- в пивоварении и виноделии;
- при очистке сточных и природных вод;
- при извлечении металлов из сточных вод;
- при ассимиляции солнечной энергии;
- при изготовлении водородных солнечных элементов;
- в азотфиксации;
- в аналитических целях при изготовлении электродов.

Таблица 9

### **Возможности применения микроорганизмов**

1. Утилизация отходов, контроль за состоянием окружающей среды
2. Получение энергии (биоэнергия)
3. Получение кормов, пищи, напитков, изделий бытовой химии
4. Замена традиционного сырья на нетрадиционные
5. Добыча минерального сырья (в т.ч. из моря)
6. Очистка и концентрация веществ
7. Получение физиологически активных соединений
8. Применение для биосинтеза, биотрансформации и биодеградации
9. Применение для целей технической микробиологии
10. Использование в здравоохранении, ветеринарии
11. Использование в биоэлектронике

### Примеры ферментов, полученных с помощью иммобилизованных клеток микроорганизмов

Фермент	Субстрат	Микроорганизмы	Носитель
$\alpha$ -Амилаза	Мясной экстракт, растворимый крахмал	<i>Bacillus subtilis</i>	ПААГ
$\alpha$ -Амилаза	Дрожжевой экстракт, растворимый крахмал	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Амберлит, каррагинан
$\alpha$ -Амилаза	Дрожжевой экстракт, триптон	<i>E. coli</i>	Пенополиуретан, пеносиликон
Целлюлазы	Целлобиаза, целлюлаза	<i>Clostridium thermocellum</i>	Криогель, поливиниловый спирт,
Целлюлазы	Жидкая питательная среда	<i>Sporotrichum sp.</i>	Полиэфирные волокна
Лигнин-пероксидаза	Глюкоза	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Нейлоновая ткань, полиуретан
Протеаза	Жидкая питательная среда	<i>B. licheniformis</i>	Анионообменная смола, ПААГ и др.

Наибольшее количество исследований по иммобилизации клеток микроорганизмов проведено японскими исследователями. Особые успехи были достигнуты ими в области синтеза аминокислот, органических кислот и антибиотиков. В Московском государственном университете был разработан метод получения аспарагиновой кислоты, который по эффективности не уступает японским. Клетки *E. coli*, включенные в армированный полиакриламидный гель, были с успехом использованы для получения аспарагиновой кислоты, период полужизни катализатора – 110 суток. Иммобилизовать можно не только клетки микроорганизмов, но и клетки растительных и животных тканей, используя их для синтеза физиологически активных соединений.

Интересные возможности открываются и при иммобилизации клеточных органелл как активных полиферментных систем. Все это свидетельствует о перспективности развития одного из направлений биотехнологии, связанного с изучением и применением иммобилизованных клеток.

#### Контрольные вопросы

1. Дайте понятие иммобилизованных ферментов. Какие требования предъявляются к носителям иммобилизованных ферментов?
2. Какие типы носителей иммобилизованных ферментов существуют?
3. Какие методы физической иммобилизации можно выделить? Опишите их.
4. Какие методы химической иммобилизации вы знаете? Опишите их.
5. Какие факторы влияют на инактивацию иммобилизованных ферментов?

## 1.4. Сырьевая база промышленной биотехнологии

Большое разнообразие биотехнологических процессов, нашедших промышленное применение, приводит к необходимости рассмотреть общие, наиболее важные проблемы, возникающие при создании любого биотехнологического производства. Процессы промышленной биотехнологии обычно разделяют на две большие группы по признаку целевого продукта – производства *биомассы* и получения *продуктов метаболизма*.

К первой группе относят получение клеточной массы продуцента, вне зависимости от того, будет ли далее использоваться живая культура (например, сахаромицеты для пищевых целей, споры с токсинами в целях защиты растений) или биомасса нежизнеспособных клеток как источник белка, витаминов и других ценных веществ для кормопроизводства.

Ко второй группе относят все процессы, где целевым продуктом становится один или несколько метаболитов, а клетки продуцентов не нужны или даже вредны после завершения фазы биосинтеза (например, получение продуктов брожения, ферментов, аминокислот, антибиотиков, микробной трансформации).

Питательные среды для культивирования микроорганизмов содержат большое количество необходимых компонентов, основным из которых обычно считают тот, который служит для микроорганизмов источником углерода и энергии. Это вещество или смесь веществ называют субстратом, а все остальные – вспомогательными веществами. Поэтому при рассмотрении сырьевой базы промышленного микробиологического синтеза оценивают доступность, методы получения, свойства и необходимые качественные характеристики тех продуктов или отходов родственных отраслей промышленности, которые в биотехнологии употребляется как субстрат или многокомпонентная смесь, содержащая необходимый клеткам субстрат и, возможно, другие полезные или балластные компоненты.

### **Продуценты белка**

Производство микробной биомассы – самое крупное микробиологическое производство. Микробная биомасса может быть хорошей белковой добавкой для домашних животных, птиц и рыб. Производство микробной биомассы особенно важно для стран, не культивирующих в больших масштабах сою (соевую муку используют как традиционную белковую добавку к кормам).

При выборе микроорганизма учитывают удельную скорость роста и выход биомассы на данном субстрате, стабильность при поточном культивировании, величину клеток. Клетки дрожжей крупнее, чем бактерий, и легче отделяются от жидкости при центрифугировании. Можно выращивать полиплоидные

мутанты дрожжей с крупными клетками. В настоящее время известны только две группы микроорганизмов, которым присущи свойства, необходимые для крупномасштабного промышленного производства: это дрожжи рода *Candida* на *n*-алканах (нормальных углеводородах) и бактерии *Methylophilus methylotrophus* на метаноле.

Микроорганизмы можно выращивать и на других питательных средах: на газах, нефти, отходах угольной, химической, пищевой, вино-водочной, деревообрабатывающей промышленности. Экономические преимущества их использования очевидны. Так, килограмм переработанной микроорганизмами нефти дает килограмм белка, а, скажем, килограмм сахара – всего 500 граммов белка. Аминокислотный состав белка дрожжей практически не отличается от такового, полученного из микроорганизмов, выращенных на обычных углеводных средах. Биологические испытания препаратов из дрожжей, выращенных на углеводородах, которые проведены и у нас в стране, и за рубежом, выявили полное отсутствие у них какого-либо вредного влияния на организм испытываемых животных. Опыты были проведены на многих поколениях десятков тысяч лабораторных и сельскохозяйственных животных. В непереработанном виде дрожжи содержат неспецифические липиды и аминокислоты, биогенные амины, полисахариды и нуклеиновые кислоты, а их влияние на организм пока еще плохо изучено. Поэтому и предлагается выделять из дрожжей белок в химически чистом виде. Освобождение его от нуклеиновых кислот также уже стало несложным.

### **1. Углеводородное сырье**

Источником углеводородов в промышленном микробном синтезе являются продукты переработки нефти, в первую очередь дизельная фракция прямой перегонки, содержащая в своем составе нормальные парафиновые углеводороды, структура и молекулярная масса которых оптимальны с точки зрения их потребления дрожжами. В одном из вариантов получения белка одноклеточных сырьем служит непосредственно фракция, из которой дожи утилизируют нормальные алканы, обеспечивая получение низкозастывающего, так называемого «зимнего» дизельного топлива. Более распространен вариант, по которому депарафинизация ведется обычными методами, а жидкие парафины очищают далее с тем, чтобы они имели оптимальные состав и свойства с точки зрения микробиологического синтеза.

#### ***а) получение нефтяных дистиллятов прямой перегонкой нефти***

Для выращивания микроорганизмов с целью получения белка хорошо бы иметь богатый углеродом, но дешевый субстрат. Этому требованию вполне отвечают нормальные (неразветвленные) парафины нефти. Выход биомассы может достигать при их использовании до 100 % от массы субстрата. Качество

продукта зависит от степени чистоты парафинов. Дрожжи, выращенные на недостаточно очищенных парафинах, содержат неметаболизированные компоненты. При использовании парафинов достаточной степени очистки, полученная дрожжевая масса может успешно применяться в качестве дополнительного источника белка в рационах животных. В нашей стране мало районов, пригодных для выращивания сои, являющейся основным источником белковых добавок. Поэтому наложено крупнотоннажное производство кормовых дрожжей на *n*-парафинах. Действует несколько заводов мощностью от 70 до 240 тыс. тонн в год. Сырьем служат жидкие очищенные парафины.

Главный источник жидких парафинов и дизельной фракции – нефть, которая состоит главным образом из парафиновых, нафтеновых и ароматических углеводородов с большей или меньшей примесью кислородсодержащих и сернистых соединений. В зависимости от месторождения соотношение в нефти различных классов углеводородов варьирует. В наиболее распространенных нефтях содержится 50–60 % нафтенов, 20–30 % углеводородов с открытой цепью и 15–30 % ароматических.

После разгонки нефти на атмосферно-вакуумной трубчатой установке (АВТ) получается ряд продуктов в следующем количестве (в % от исходного количества нефти) и выкипающих в следующем температурном режиме:

<i>Продукты</i>	<i>Количество, %</i>	<i>Температура, °С</i>
Сжиженный газ	1,0–1,2	до 50
Бензиновая фракция	12–18	50–140
Керосиновая фракция	16–18	120–240
Дизельная фракция	17–21	200–360
Вакуумный дистиллят	22–23	350–500
Гудрон	20–30	Свыше 500

Наиболее экономичным и доступным сырьем для производства кормовой биомассы могут служить дизельные фракции парафинистой и высокопарафинистой нефти, содержащие не менее 15 % *n*-алканов для их последующего использования.

Микробиологическая депарафинизация дизельной фракции (нефтяных дистиллятов) позволяет осуществить комплексную переработку сырья, получая одновременно три целевых продукта: кормовую биомассу, технический био жир, компонент дизельного топлива с пониженной температурой замерзания.

### **б) получение нормальных парафинов для культивирования микроорганизмов переработкой нефтяных дистиллятов**

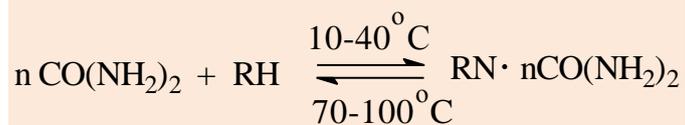
Для получения кормовой биомассы широко используются очищенные жидкие парафины с температурой кипения от 180 до 350°C следующего состава (в %):

<i>n</i> -алканы	87–98
ароматические углеводороды	не более 0,5
сера	не более 0,05

Выделение парафинов с температурой плавления менее 30°C (жидкие парафины) можно осуществлять несколькими способами. При получении *n*-алканов с длиной цепи C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub> как сырья для микробиологической промышленности используют:

*карбамидную депарафинизацию дизельной фракции:*

*n*-парафины способны образовывать с мочевиной (карбамидом) легко разлагаемые кристаллические соединения по реакции:



*адсорбционное извлечение жидких парафинов:*

Извлечение фракции C<sub>10</sub>-C<sub>18</sub> основано на способности цеолитов избирательно сорбировать вещества с определенными размерами и конфигурацией молекул. Процесс состоит из двух стадий: адсорбция нормальных алканов на цеолитах (с размером пор до 0,5 нм) и их десорбция из пор цеолита. Десорбцию можно проводить с помощью снижения давления, повышения температуры, вытеснением другим веществом (*n*-пентаном, *n*-гексаном, аммиаком и др.).

## **2. Получение этилового спирта**

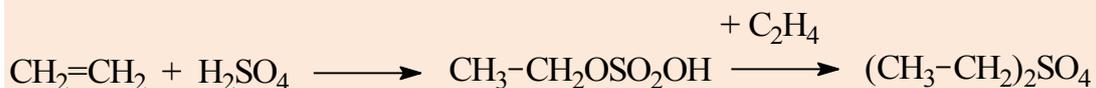
Использование этанола как субстрата снимает проблему очистки биомассы от аномальных продуктов обмена с нечетным числом углеродных атомов. Стоимость такого производства несколько выше. Биомассу на основе этанола производят в Чехословакии, Испании, Германии, Японии, США.

Основным источником этанола является нефтехимический синтез, использующий реакцию гидратации этилена в присутствии различных катализаторов. Известны также промышленные способы получения так называемого гидролизного спирта сбраживанием гексоз, содержащихся в гидролизатах растительного сырья, и высококачественного «пищевого» этанола, образующегося в процессе брожения моносахаридов при ферментативном гидролизе крахмала.

### а) сернокислотная гидратация этилена

Процесс осуществляется в две стадии:

- адсорбция этилена концентрированной серной кислотой с образованием моно- и диалкилсульфатов:

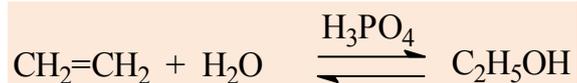


- гидролиз полученных алкилсульфатов водой:



В качестве побочного продукта образуется диэтиловый эфир.

### б) прямая гидратация этилена водяным паром



Образование этанола из этилена и воды с использованием в качестве катализатора фосфорной кислоты, нанесенной на инертный носитель, протекает по обратимой реакции. Поскольку разбавление этилена инертными примесями неблагоприятно сказывается на равновесии и скорости этой реакции, исходный газ должен содержать не менее 97–99 % этилена. При рециркуляции газа постепенно накапливаются инертные примеси: предельно допустимой считается концентрация этилена в рециркулирующем газе не менее 85 %, для ее поддержания проводят отдувку части рециркулирующего газа.

Фактическая степень конверсии этилена за один проход составляет около 60 % от равновесной, т.е. около 4–5 %, что обеспечивает после конденсации паров получения водного раствора, содержащего до 15 % этанола. Использование рециркуляции газовой смеси позволяет повысить общий выход спирта до 95 % по этилену.

Полученный азеатроп этанола с водой является товарным продуктом с содержанием ингибирующих примесей не более 0,007 % и может с успехом использоваться в микробиологической промышленности в качестве субстрата при культивировании микроорганизмов как кормового, так и пищевого назначения.

### 3. Сырье для культивирования метилтрофов

Метилтрофы способны утилизировать так называемые «одноуглеродные» соединения, т.е. производные метана – метанол, формальдегид, метиламины и т.д. Одним из перспективных источников углерода для культивирования продуцентов белка высокого качества считается метиловый спирт, так как это один из крупнотоннажных продуктов химической промышленности, который может быть получен как из нефтехимического (метан), так и из углехимического (кокс) сырья. Его можно получать методом микробного синтеза на таких субстратах, как древесина, солома, городские отходы. Использование метанола в качестве субстрата затруднено из-за его химической структуры: молекула метанола содержит один атом углерода, тогда как синтез большинства органических соединений осуществляется через двухуглеродные молекулы. Наилучшими продуцентами на этом субстрате считаются бактерии, потому что они могут расти на метаноле с добавлением минеральных солей. Процессы получения белка на метаноле достаточно экономичны.

Метанол получают, используя синтез-газ.



Реакция катализируется оксидами цинка, меди, хрома и т.д. и позволяет в силу своей высокой селективности получать метанол с концентрацией 99,9 % и содержанием нежелательных для биотехнологии примесей не более 0,005 %, что вполне допустимо.

Ранее CO в виде смеси с другими газами (водяной газ) получали из каменноугольного кокса по реакциям:

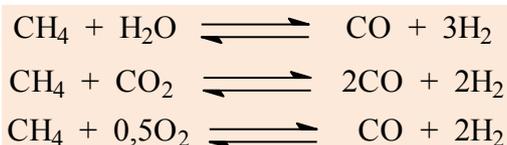


В этом случае твердое топливо подвергается газификации при атмосферном или повышенном давлении. В качестве окислителя используют водяной пар (паровое дутье) или смесь водяного пара с кислородом (парокислородное дутье). Получаемый в результате водяной газ имел соотношение  $\text{CO}:\text{H}_2 < 2$ , что делало необходимым перед синтезом метанола регулировать состав газа путем конверсии CO водяным паром по реакции:



с последующей очисткой конвертируемого газа от диоксида углерода. Ввиду дефицитности кокса и несовершенства технологии его газификации эти методы были вытеснены другими, основанными на переработке природного газа, или газификации каменного угля с переработкой его через монооксид углерода в синтетические продукты и моторное топливо. Процесс газификации может быть периодическим или непрерывным. Для получения синтез-газа с соотношением  $\text{CO}:\text{H}_2=1,5-1,9$  из крупнокускового топлива применяются печи с циркуляцией теплоносителя, позволяющие производить процесс газификации в непрерывном режиме. Он нашел применение на заводах по получению искусственного жидкого топлива.

Полученный синтез – газ конверсий метанола водяным паром,  $\text{CO}_2$  или неполным его окислением кислородом:



Поскольку во всех реакциях образуется монооксид углерода, а в дутье имеется вода, то происходит вторичный процесс их взаимодействия:

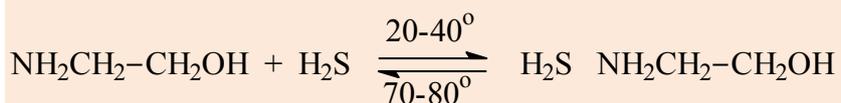


Существуют три основных метода конверсии метана с получением синтез-газа различного состава:

- собственно конверсия водяным паром,  $\text{CO}_2$  или их смесью на никелевом катализаторе при  $750-800^\circ\text{C}$ , в этом случае процесс является сильно эндотермическим.
- окислительная конверсия смесью водяного пара с кислородом на никелевом катализаторе при  $900-950^\circ\text{C}$ . Здесь для компенсации эндотермичности реакции используют теплоту сгорания части углеводородов в реакционном пространстве. При соотношении  $\text{CH}_4:\text{O}_2:\text{H}_2\text{O} = 1:0,55:1$  суммарный процесс становится несколько экзотермическим и эта теплота расходуется на подогрев исходной смеси и компенсацию потерь теплоты в окружающую среду.
- неполное окисление метана кислородом без катализатора при  $1200-1500^\circ\text{C}$ . К недостаткам этого метода следует отнести выделение свободного углерода и получение соотношения  $\text{CO}:\text{H}_2 < 2$ .

## Подготовка сырья для микроорганизмов, утилизирующих CH<sub>4</sub>

Альтернативой использования метанола для получения микробного белка являются культивирования продуцентов, способных утилизировать непосредственно метан так называемых метанотрофов. В США, Японии, Канаде, ФРГ, Великобритании разработаны технологические процессы получения белка на природном газе. Выход биомассы в этом случае может составлять 66 % от массы субстрата. В разработанном в Великобритании процессе используется смешанная культура: бактерии *Methylomonas*, усваивающие метан, *Hypermicrobium* и *Pseudomonas*, усваивающие метанол, и два вида неметилотрофных бактерий. Культура характеризуется высокой скоростью роста и продуктивностью. Главные достоинства метана (кстати сказать, основного компонента природного газа) – доступность, относительно низкая стоимость, высокая эффективность преобразования в биомассу метанооксиляющими микроорганизмами, значительное содержание в биомассе белка, сбалансированного по аминокислотному составу. Бактерии, растущие на метане, хорошо переносят кислую среду и высокие температуры, в связи с чем устойчивы к инфекциям. Этот процесс перспективен, поскольку метан – основной компонент природного газа и его концентрация может приближаться (для некоторых месторождений) к 100 %. Вместе с тем круг метанотрофов сравнительно ограничен, а имеющийся в нашей стране природный газ требует перед подачей в ферментер дополнительной очистки, в первую очередь от сероводорода и других серосодержащих соединений, сильно ингибирующих рост клеток. Очистка от меркаптанов, сероводорода и воды осуществляется с помощью моноэтаноламина по обратимой реакции:



Полученный после очистки природный газ имеет следующий состав (% по объему):

метан	не менее 95
диоксид углерода	не более 1
гомологи: этан	более 2
сероводород	не более 0,01
пропан	не более 1
серосодержащие соединения	не более 0,001
сумма остальных	не более 1

Такой природный газ является товарным продуктом, полностью соответствует требованиям микробиологической промышленности и может быть использован для культивирования микроорганизмов.

#### **4. Получение углеводов гидролизом растительного сырья**

Исключительно доступным и достаточно дешевым источником углеводов для производства микробного белка является растительная биомасса. Любое растение содержит разнообразные сахара. Целлюлоза – полисахарид, состоящий из молекул глюкозы. Гемицеллюлоза состоит из остатков арабинозы, галактозы, маннозы, фруктозы. Проблема в том, что полисахариды древесины связаны жесткими оксифенилпропановыми звеньями лигнина – полимера, почти не поддающегося разрушению. Поэтому гидролиз древесины происходит только в присутствии катализатора – минеральной кислоты и при высоких температурах. При этом образуются моносахара – гексозы и пентозы. На жидкой, содержащей сахара, фракции гидролизата выращивают дрожжи. При кислотном гидролизе древесины образуется ряд побочных продуктов (фурфурол, меланины), а из-за высоких температур может произойти карамелизация сахаров. Эти вещества препятствуют нормальному росту дрожжей, их отделяют от гидролизата и по возможности используют. В качестве продуцентов используют штаммы *Candida scotti* и *C.tropicalis*.

Наиболее крупным производителем сырья для гидролизной промышленности являются деревообрабатывающие предприятия, отходы которых достигают ежегодно десятки миллионов тонн. К сожалению, нерационально или не используются вообще отходы производства лубяных волокон (из льна и конопли), картофелекрахмального производства, пивоваренной, плодоовощной, консервной промышленности, свекловичный жом.

Гидролиз растительного, главным образом древесного сырья, предназначенный первоначально для получения гексоз, дающих при сбраживании этанол, служит почти исключительно для *изготовления гидролизатов как сырья для аэробного культивирования дрожжей*. Гидролизаты содержат смесь моносахаридов ( $C_5$  и  $C_6$  – пентозы, гексозы) и примеси, нежелательные для микробного синтеза, но трудно отделенные из получающегося разбавленного раствора углеводов. Важнейшим побочным продуктом гидролиза оказывается фурфурол, химический синтез которого затруднен и не реализован в промышленности, следовательно, тщательное отделение фурфурола, а для так называемого пентозосодержащего сырья – подсолнечной и хлопковой шелухи, кукурузных кочерыжек и др. – режим гидролиза подбирается в расчете на наибольший выход фурфурола.

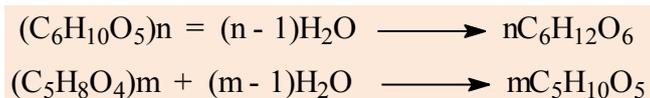
Химический состав переработанного растительного сырья неодинаков, колеблется в широких пределах. Главной частью этого сырья являются полиса-

хариды – 40–75 % и лигнин – 15–60 % (все не растворимые при кислотном гидролизе полисахаридов компоненты растительного сырья).

Полисахариды растительного сырья делятся на легко- и трудногидролизуемые. Легкогидрализуемая часть полисахаридов состоит из гемицеллюлоз и пектиновых веществ (15–40 %), трудногидрализуемая часть состоит из целлюлозы с небольшой примесью гемицеллюлоз (25–50 %).

Наибольшее количество моносахаридов может быть получено при гидролизе кукурузной кочерыжки и древесины хвойных и лиственных пород.

*Полный гидролиз древесины (полисахаридов):*



Соотношение между гексозами и пентозами не имеет существенного значения при выращивании кормовых дрожжей, поскольку обе группы утилизируются микроорганизмами. Ацетильные группы в гемицеллюлозах отщепляются и при полном гидролизе образуют уксусную кислоту, которая при культивировании кормовой биомассы усваивается наравне с моносахаридами. Легкоотщепляемые метоксильные группы при гидролизе образуют метиловый спирт, содержание которого может достигать 2–7 кг на 1 т абсолютно сухого сырья. Азотистые вещества в большей степени состоят из белков, которые при гидролизе распадаются до аминокислот. Небольшая часть негидролизованного белка остается в лигнине.

Лигнин – нерастворенный остаток растительного сырья – находит ограниченное применение и является балластом. При гидролизе хвойных пород (2–10 % смолы) часть смолы образует эмульсию и вместе с коллоидным лигнином и продуктами распада сахаров оседает на стенках труб и приемника.

Основным способом гидролиза растительного сырья был и остается перколяционный гидролиз разбавленной серной кислотой при повышенном давлении и температуре. По этому способу горячая разбавленная кислота (жидкая фаза) непрерывно протекает через слой неподвижной твердой фазы (измельченное растительное сырье). Основными недостатками процесса перколяционного гидролиза древесины являются образование крупнотоннажного отхода – лигнина и низкое качество гидролизата с точки зрения микробиологического синтеза, ограничивает применение гидролизата только производством белково-витаминного концентрата (гидролизные дрожжи), во всех остальных биотехнологических производствах это сырье оказывается неприемлемым.

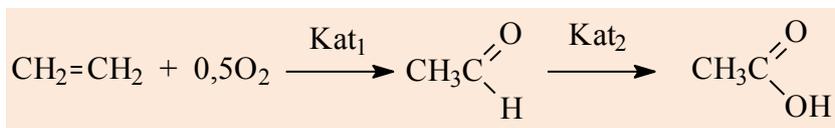
Более перспективными способами можно считать автогидролиз (без добавления кислот-катализаторов), или ступенчатый гидролиз с постепенным извлечением пентоз и гексоз, которые могут быть получены отдельно.

## 5. Получение уксусной кислоты

Пищевая АсОН издавна получается путем окисления этанола культурами бактерий рода *Acelobacter*.

Было установлено, что уксусная кислота представляет собой очень перспективный субстрат для биотехнологии, на ней очень хорошо развиваются дрожжи как источник микробного белка, интересно применение уксусной кислоты в биосинтезе лизина:

### а) получение уксусной кислоты из этилена

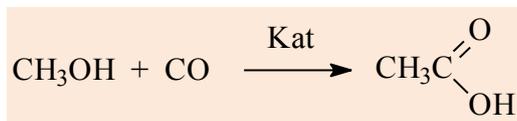


Процесс окисления ацетальдегида прямым окислением этилена проводят в одну стадию с использованием в качестве катализатора (Kat<sub>1</sub>) водного раствора хлоридов палладия и меди (PdCl<sub>2</sub>\*CuCl<sub>2</sub>), что обеспечивает достаточно интенсивное протекание процесса при 110–130°C. Для поддержания катализатора при этих температурах в растворе необходимо избыточное давление 0,3–0,7 МПа, которое также способствует ускорению процесса за счет повышения растворимости этилена в реакционной массе.

На втором этапе получения уксусной кислоты проводят жидкофазное окисление ацетальдегида, используя в качестве катализатора (Kat<sub>2</sub>) раствор ацетата марганца в уксусной кислоте (0,05–0,1 % по отношению к массе ацетальдегида), проводят реакцию при температуре 50–80°C. Применение других катализаторов и снижение температуры ведет к накоплению надуксусной кислоты, что увеличивает взрывоопасность процесса. Повышение температуры ограничено высокой летучестью ацетальдегида и ускорением побочных реакций.

### б) получение уксусной кислоты карбонилированием метанола

Производство уксусной кислоты из метанола в промышленности основано на взаимодействии спирта с монооксидом углерода при катализе комплексами Co и Rh или смесью CoH(CO)<sub>4</sub> + CoI<sub>2</sub> по реакции:



При использовании катализаторной системы из гидрокарбонила Со и иодида Со процесс синтеза кислоты протекает при температуре 180–200°C и давлении 40–70 МПа. Этот метод позволяет базировать производство уксусной кислоты на природном газе (метан-синтез → газ → метанол → уксусная кислота) или на каменном угле (водяной газ → метанол → уксусная кислота) и относится к одному из самых экономичных.

## 6. Меласса как субстрат для биотехнологии

Меласса – отход сахарного производства (содержит до 50 % сахарозы) и широко используется в микробиологическом синтезе, т.к. многие продуценты белка и БАВ прекрасно утилизируют углеводы из мелассы. В связи с необходимостью увеличения производства сахара происходит более полная утилизация сахарозы из клубней сахарной свеклы, в этих целях процесс сахароварения непрерывно совершенствуется за счет снижения процента сахара, попадающего в мелассу (20–30 %). Такой продукт будет представлять тем меньший интерес для биотехнологии, чем ниже содержание в нем сахарозы.

## 7. Получение гидролизатов торфа для биосинтеза белка

Одним из перспективных источников углеводного сырья для получения кормовых дрожжей является верховой торф со степенью разложения не выше 20 %, содержащий в своем составе до 50 % полисахаридов и до 15–17 % урановых кислот. При мягком гидролизе до 80 % урановых кислот торфа переходят в раствор и, легко декарболизируясь, превращаются в пентозу по реакции:



Таким образом, торф, содержащий значительные количества азота и фосфора в легкоусвояемой форме, после предварительной подготовки может служить хорошим сырьем.

В связи с тем, что торф оказывает большое гидравлическое сопротивление проходящей через него жидкости, что не позволяет обеспечить необходимую скорость отбора гидролизата, широко распространенный перколяционный способ гидролиза непригоден для торфа. Невысокое содержание целлюлозы не дает повышения выхода моносахаридов при увеличении времени гидролиза, а замедленная скорость фильтрации приводит к разложению, образуется из легкогидралитической части моносахаридов. Низкая скорость диффузии сахаров из частичек торфа не дает возможности полностью удалять их из гидролитической массы и гидролизат не насыщается сахарами.

Используют наиболее перспективный непрерывный гидролиз разбавленной серной кислотой.

## 8. Отходы целлюлозно-бумажной промышленности для культивирования микроорганизмов

Основными отходами целлюлозно-бумажной промышленности являются предгидролизаты и сульфитный щелок.

**Предгидролизаты** образуются при первичной обработке древесной щепы горячей водой для удаления гемицеллюлоз. Отщепляется связанная уксусная кислота и переходит в водный раствор ( $\text{pH} \sim 4,5$ ). Это способствует протеканию частичного гидролиза гемицеллюлоз и накоплению в водном растворе продуктов её деполимеризации. При варке целлюлозы образуется до  $6 \text{ м}^3$  предгидролизатов на 1 т древесины. Также как гидролизатов растительного сырья.

Вторым отходом целлюлозно-бумажной промышленности является **сульфитный щелок** –  $6,5\text{--}8 \text{ м}^3$  на 1 т целлюлозы. Для выделения целлюлозы из древесины используется сульфитный метод, при котором обрабатывают при повышенном давлении и температуре водным раствором солей сернистой кислоты. Нецеллюлозные компоненты древесного сырья, переходящие в раствор, можно после обработки и подготовки использовать в микробиологической промышленности.

### **Сульфатные варки:**

1. Моносульфитная – процесс варки при  $\text{pH}=6\text{--}7$ , вся сернистая кислота находится в связанном состоянии в виде моносульфита кальция ( $\text{CaSO}_3$ ).

2. Биосульфитная – процесс варки при  $\text{pH}=4,0\text{--}4,2$ , весь диоксид серы связан в виде  $\text{Ca}(\text{HSO}_3)_2$  без избытка  $\text{SO}_2$  в среде.

3. Кислая бисульфитная – процесс варки при  $\text{pH}=1,0\text{--}1,5$ , вместе с  $\text{Ca}(\text{HSO}_3)_2$  имеется значительный избыток  $\text{SO}_2$ .

### **Контрольные вопросы**

1. Какое углеводородное сырье используют для биотехнологического процесса? Опишите способы его получения.

2. Приведите методы получения этилового спирта.

3. Что такое сырье для культивирования метилтрофов? Опишите получение синтез-газа.

4. Как можно получить углеводы гидролизом растительного сырья?

5. Опишите получение уксусной кислоты.

6. Опишите получение гидролизатов торфа для биосинтеза белка.

7. Какие отходы целлюлозно-бумажной промышленности используются для культивирования микроорганизмов?

## 1.5. Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов

На сегодняшний день установилась сложная система взаимосвязи и конкуренции между промышленной биотехнологией и химической технологией, так как наряду с биосинтезом многие биологически активные вещества могут быть получены методами тонкого органического синтеза, поэтому выбор конкретного пути получения продукта определяется сравнительной экономической эффективностью биологических и химических способов производства. Во многих случаях на практике используют технологию, включающую и химические, и биологические стадии, которые взаимно дополняют друг друга.

### Производство первичных метаболитов. Биосинтез аминокислот

К первичным метаболитам относят низкомолекулярные соединения, необходимые для роста микробной клетки. Одни из них являются строительными блоками макромолекул, другие участвуют в синтезе коферментов. К ним можно отнести аминокислоты, органические кислоты, пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды, витамины. Микробные клетки не производят избытка первичных метаболитов (это было бы расточительно и уменьшало бы способность к выживанию). Штаммы микроорганизмов с нарушениями регуляции синтеза будут являться исходными штаммами для промышленных процессов.

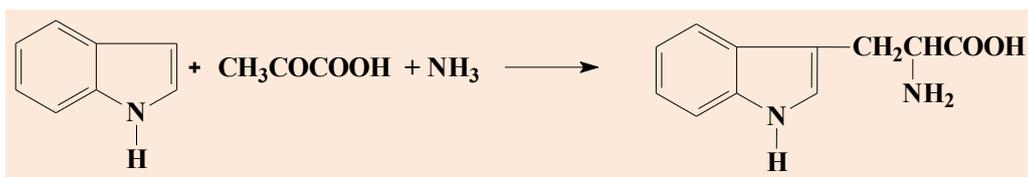
Производству аминокислот, после кормового белка, уделяют наибольшее внимание среди возможных способов их в промышленном масштабе. Наибольшее значение имеют микробиологический и химический.

Примеры химических способов получения аминокислот:

1. Синтез D,L-метионин из акролеина



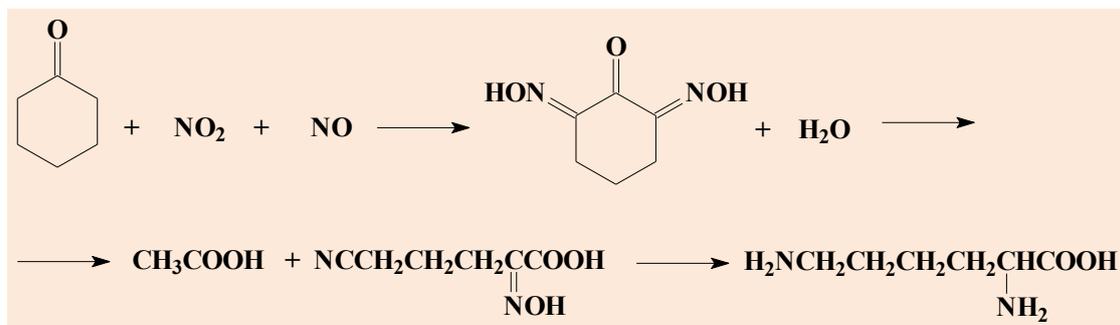
2. Синтез D,L-триптофан из нитроуксусного эфира



### 3. Синтез L-глутамата натрия из акрилонитрила



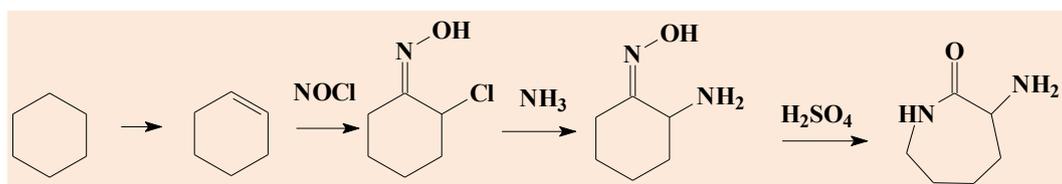
### 4. Синтез L-лизина из циклогексанона



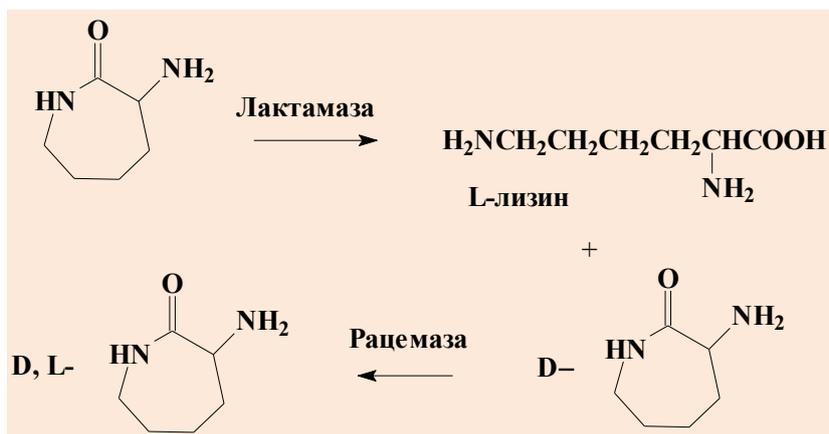
### Комбинированный или ферментативный способ получения L-лизина

При получении ряда аминокислот химико-ферментативными способами используют ферменты, принадлежащие к разным классам. Эти процессы могут быть как одностадийными (конверсии), так и многостадийными. Источником ферментов для большинства процессов служат ферменты микроорганизмов – как индивидуальные, так и их природные смеси, содержащиеся в интактных (не растущих), высушенных и лизированных клетках, клеточных экстрактах и, наконец, в препаратах иммобилизованных клеток и ферментов. Применение ферментов в производстве аминокислот обеспечивает стереоспецифичность процессов их синтеза, что выгодно отличает биотехнологические производства от химических.

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



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



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

Необходимые ферменты имеют видимо микробиологическое происхождение, например, такие как L-гидролиза и L-рацемаза. Известно, что гидролазу продуцируют штаммы дрожжей родов *Cryptococcus*, *Candida*, *Trichosporon*. Рацемазу получают при культивировании бактерий рода *Achromobacter*, *Flavobacterium* и др.

Для химических способов получения аминокислот, как правило, характерно большое количество операций.

### **Производство аминокислот из белковых гидролизатов**

Аминокислоты можно также получить кислотным, щелочным или ферментативным гидролизом некоторых наиболее доступных природных белков.

К их числу относятся отходы мясной промышленности, казеина молока, клейковина пшеницы и др.

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

Для выделения отдельных аминокислот из гидролизата проводят сложную многостадийную очистку, включающую в себя:

- ✓ *нейтрализацию среды выделения,*
- ✓ *ионообменную хроматографию,*
- ✓ *аффинную хроматографию,*
- ✓ *концентрирование аминокислоты,*
- ✓ *лиофилизацию аминокислоты с последующей фасовкой.*

#### **Основные недостатки данного способа:**

- Сложность процесса выделения и очистки.
- Кроме того, само сырье считается дефицитным и дорогим, поэтому аминокислоты имеют высокую себестоимость.
- Часть аминокислот может разрушиться (такие как триптофан, цистеин, метионин, тирозин).
- Происходит рацемизация.

#### **Производство L-аминокислот микробиологическим синтезом**

Преимущество микробиологического способа получения аминокислот состоит в том, что используемые микроорганизмы образуют аминокислоты в биологической активной форме – L.

Промышленное производство аминокислот стало возможным после открытия способности у некоторых микроорганизмов выделять в культуральную среду значительные количества какой-либо одной аминокислоты (С. Киносита, 1955). При этом было подмечено, что большинство из нескольких тысяч проанализированных диких штаммов микроорганизмов продуцировали аминокислоты во внешнюю среду, но в очень незначительных количествах. Не зафиксировано никакой связи между таксономическим положением микроорганизма и способностью к продуцированию той или иной аминокислоты. Так, среди возможных продуцентов глутаминовой кислоты отмечены организмы, из которых 30 % – дрожжи, 30 % – стрептомицеты, 20 % – бактерии и 10 % – микроскопические грибы. И лишь один из обследованных штаммов микроорганизмов – *Corynebacterium glutamicum* – был способен к сверхсинтезу глутамата. Этот штамм использовали при организации первого в мире крупномасштабного производства глутаминовой кислоты микробиологическим методом в Токио (1956). В России изыскания в области промышленного синтеза аминокислот были начаты в 50-х гг. прошлого столетия по инициативе акад. А.А. Александрова.

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

Таблица 11

**Микроорганизмы – продуценты аминокислот**

Аминокислота	Микроорганизмы
Аргинин	<i>E. coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Corynebacterium glutamicum</i> , <i>Brevibacterium flavum</i> , <i>Serratia marcescens</i>
Гистидин	<i>B. flavum</i> , <i>C. glutamicum</i> , <i>S. marcescens</i> , виды <i>Streptomyces</i>
Изолейцин	<i>B. flavum</i> , <i>C. glutamicum</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. marcescens</i>
Лейцин	<i>Brevibacterium lactofermentum</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>C. glutamicum</i>
Лизин	<i>B. flavum</i> , <i>C. glutamicum</i>
Фенилаланин	<i>B. flavum</i> , <i>C. glutamicum</i>
Пролин	<i>B. flavum</i>
Серин	<i>C. glutamicum</i>

Микробиологический способ получения аминокислот включает два пути: **одноступенчатый** и **двухступенчатый** способы.

**Двухступенчатый** способ основан на использовании в качестве источника сырья одного из предшественников протекающего в клетке биосинтеза необходимой аминокислоты, полученного химическим или биологическим методом. *Первая ступень* – образование и подготовка необходимого предшественника, биосинтез ферментативного препарата для трансформации предшественника в целевую аминокислоту. При этом в производственных условиях выращивают продуцент ферментов (биомассу микроорганизма). Биомассу отделяют от культуральной жидкости и употребляют непосредственно для трансформации, либо после предварительного разрушения клеток различными доступными способами.

*Вторая стадия* представляет собой собственно процесс трансформации предшествующих в аминокислоту с помощью ферментативных систем микроорганизма, выращенного на первой стадии.

Наиболее распространенным является одноступенчатый способ, который основан на культивировании строго определенного штамма – продуцента определенной аминокислоты на среде заданного состава при соответствующих параметрах процесса ферментации.

В состав белка микробных клеток входят все 20 аминокислот, биосинтез, который у прототрофных культур осуществляется из компонентов среды, содержащих углерод, азот и серу. В качестве источников углерода можно назвать углеводы, углеводороды и продукты их неполного окисления: несмотря на многообразие источников углерода в результате функционирования таких метаболических последовательностей, как гидролиз пути Энтнера-Дударова и пентозофосфатный путь, а также цикл трикарбоновых кислот, почти всегда образуются одни и те же углеводородные предшественники аминокислот и лишь синтез гистидина имеет несколько обособленный путь.

**Источники углерода:**

**Пируват** – аланин, валин, лейцин.

**3-фосфоглицерат** – серин, глицин, цистеин.

**Щавелево-уксусная кислота** – аспарат, аспарагин, метионин, лизин, треонин, изолейцин.

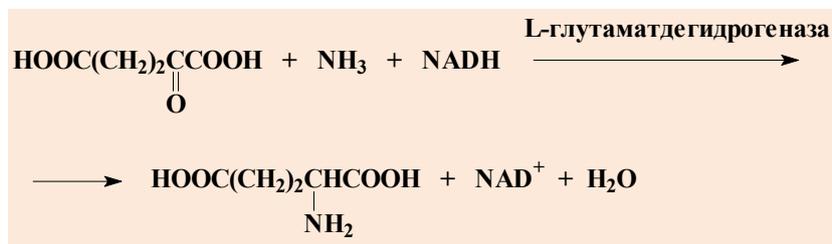
**$\alpha$ -кетоглутаровая кислота** – глутамат, глутамин, аргинин, пролин.

**Фосфопируват + эритрозо-4-фосфат** – фенилаланин, тирозин, триптофан.

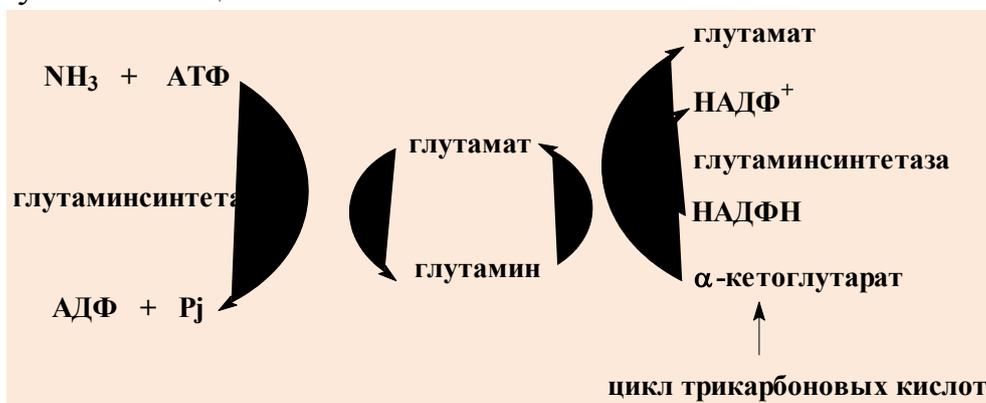
**5-фосфорибозил-1-пирофосфат + АТФ** – гистидин.

**Источники азота.** Источниками азота могут быть аммонийные соли, нитраты и молекулярный азот. Поскольку степень окисления азота в амми-

аке соответствует его степени окисления во всех органических веществах клетки, соли аммония предположительно усваиваются большинством бактериальных и дрожжевых культур. Ассимиляция аммиака, приводящая к образованию аминокруппы глутаминовой кислоты, может осуществляться путем восстановительного аминирования  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты:



и через глутаматный цикл:



Глутаминовая кислота – основной донор аминокрупп для других синтезируемых клеткой аминокислот: с помощью трансаминаз возможно образование более чем 10 аминокислот из соответствующих кетокислот.

Нитраты как источники азота употребляются целым рядом микроорганизмов (микроводоросли, грибы, некоторые виды бактерий). Прежде чем азот нитратов включится в аминокислоты, нитрат-ион должен быть восстановлен путем превращения в аммиак.



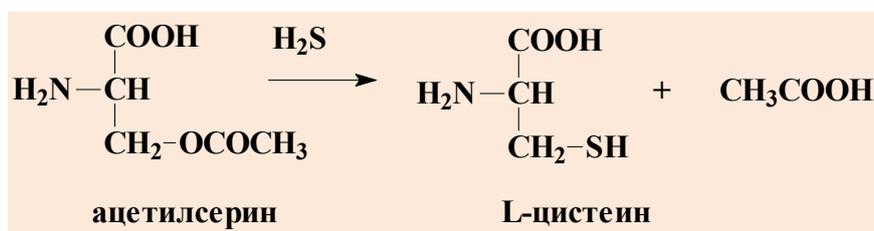
Ассимилирующее восстановление нитрата осуществляется с помощью растворенных ферментативных систем, не чувствительных к кислороду и не сопряженных с реакциями, генерирующими АТФ. Нитратредуктаза – молибденсодержащий фермент, поэтому присутствие молибдена в средах с нитрата-

ми обязательно. Аммиак репрессирует синтез фермента, ассимилирующего восстановления нитратов.

Небольшая группа прокариот – свободноживущие и симбиотические азотфиксаторы – способна включать в аминокислоты азот атмосферы; азот восстанавливается до аммиака в присутствии фермента системы – нитрогеназы, состоящей из двух белковых субъединиц: азоферредоксина и молибденферредоксина.

Восстановление азота до аммиака также осуществляется в присутствии источника молибдена в среде.

**Источники серы.** Большинство микроорганизмов употребляют сульфаты, предварительно осуществив ассимилирующее восстановление до сульфидов, так как сероводород токсичен для микробной клетки (кроме серобактерий), он немедленно включается в ацетилсерин.



L-цистеин служит предшественником всех серосодержащих компонентов клетки.

### **Производство вторичных метаболитов. Технология биосинтеза препаратов антибиотиков**

*Вторичные метаболиты (идиолиты)* – низкомолекулярные соединения, не требующиеся для роста в чистой культуре. Они производятся ограниченным числом токсикологических групп и часто представляют собой смесь близкородственных соединений, относящихся к одной и той же химической группе. К ним относятся алкалоиды, гормоны роста и токсины.

Современное определение термина «антибиотик» принадлежит М.М. Шемякину и А.С. Хохлову, которые предложили считать антибиотическими веществами все продукты обмена любых организмов, способные убивать или подавлять рост и развитие микроорганизмов (бактерии, грибы, вирусы), а также некоторых злокачественных новообразований. Только половина антибиотиков может быть получена химическим путем. Синтез микроорганизмами антибиотиков – одна из форм проявления антагонизма – связан с определенным характерным обменом веществ, возникшим и закрепленным в ходе его эволюции, то есть это наследственная особенность, выражающаяся в образовании одного и более определенных, строго специфических для каждого вида антибиотических

веществ. Воздействуя на постороннюю клетку, антибиотик вызывает значительные нарушения в её развитии. Некоторые из антибиотиков способны подавлять синтез оболочки бактериальной клетки в период размножения, другие воздействуют на ее цитоплазматическую мембрану, изменяя проницаемость, часть из них является ингибиторами реакций обмена веществ.

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

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

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

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

К числу антибиотических веществ, нашедших наиболее широкое применение в борьбе с фитопатогенами, относятся прежде всего фитобактериомицин, трихотецин и полимицин.

Микроорганизмы, производящие вторичные метаболиты, вначале проходят стадию быстрого роста, тропофазу, во время которой синтез вторичных веществ незначителен. По мере роста из-за истощения одного или нескольких необходимых питательных веществ в культуральной среде микроорганизм переходит в идиофазу (именно в этот период синтезируется идиолиты). В случае антибиотиков большинство микроорганизмов в процессе тропофазы чувствительно к собственным антибиотикам, однако во время идиофазы они становятся к ним устойчивыми. Чтобы уберечь микроорганизмы, продуцирующие антибиотики, от самоуничтожения, важно быстро достичь идиофазы и затем культивировать микроорганизмы в этой фазе.

Экономическая возможность наглядно проявляется в стоимости мирового сбыта четырех наиболее распространенных групп антибиотиков – пенициллинов, цефалоспоринов, тетрациклинов и эритромицинов.

Шесть родов филаменторных грибов производит ~ 1000 различных антибиотиков (цефалоспорины и пенициллин). Два рода нефиломентозных бактерий ~ 500; а 3 рода актиномицетов ~ 3000 антибиотиков (наибольший вклад – род *Streptomyces*, включая тетрациклеин).

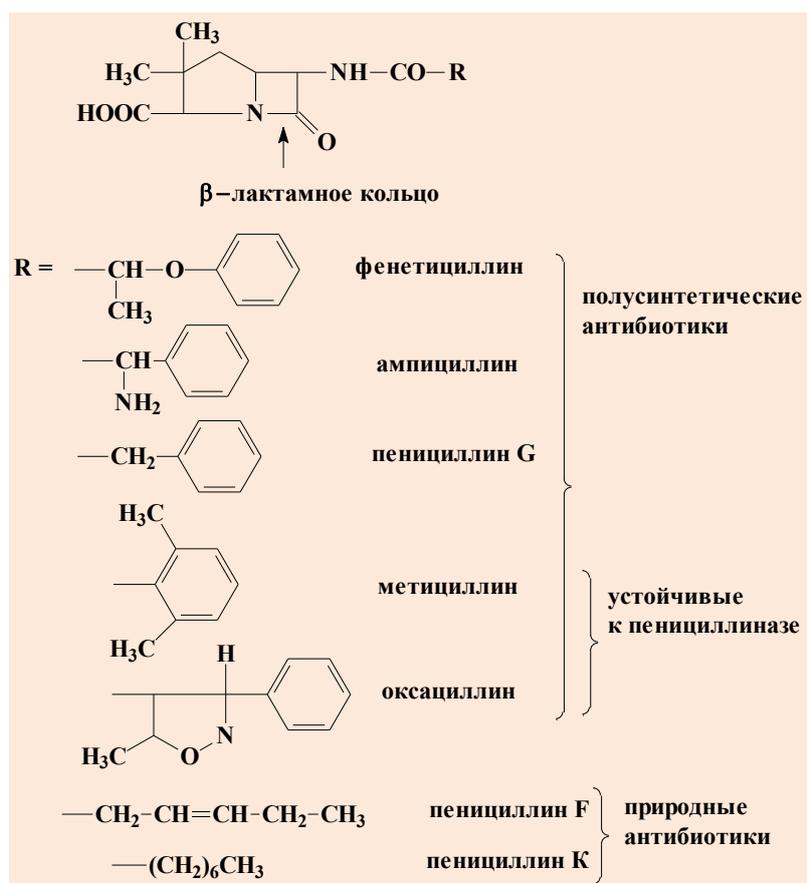
Начиная с середины 1960-х гг. в связи с возросшей сложностью выделения эффективных антибиотиков и распространенной устойчивости к наиболее широко применяемым соединениям у большого числа патогенных бактерий исследователи перешли от поиска новых антибиотиков к модификации имеющихся.

#### ***Способы получения антибиотиков:***

- биосинтетические (природные), их продуцентами выступают специальные штаммы микроорганизмов;
- полусинтетические, получаемые химическим соединением природного антибиотика, точнее его «ядра», с различными химическими радикалами (при этом возможно направленное создание препаратов с заданными свойствами);
- синтетические антибиотики, источник их получения – химический синтез, возможный после определения структуры природных препаратов (например, синтетическим путём получают левомицетин).

Биосинтетические пенициллины (бензилпенициллин, феноксиметилпенициллин) оказывают действие на грамположительные и ограниченное число грамотрицательных микроорганизмов. Препараты не проникают в большинство грамотрицательных бактерий и инактивируются бактериальными В-лактамазами (пенициллиназами).

## Некоторые природные и полусинтетические пенициллины



Препараты I поколения отличает узкий спектр действия, направленный преимущественно в отношении грамположительных микроорганизмов, включая штаммы-продуценты  $\beta$ -лактамаз (оксациллин, клоксацillin, флуклоксациллин).

Препараты II и III поколений отличает широкий спектр действия, но они инактивируются  $\beta$ -лактамазами (аминопенициллины, ампициллин, амоксициллин), активны в отношении грамположительных кокков и ряда аэробных и факультативно анаэробных грамотрицательных бактерий.

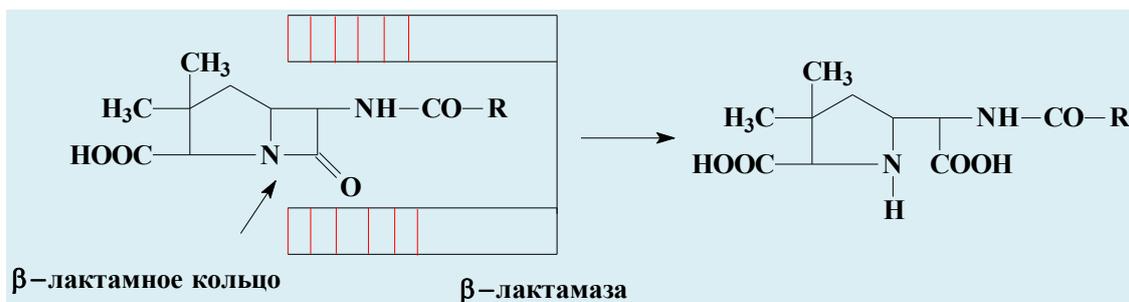
Полусинтез антибиотика состоит в замене химическим путем одной боковой цепи  $\beta$ -лактамого кольца на другую в полученной ферментацией молекуле.

В случае пенициллинов *полусинтетический подход* реализуется для пенициллина G, который непрерывно синтезируется *Penicillium Chrysogenum* в присутствии фенилуксусной кислоты, которая является предшественником бензильной боковой цепи молекулы антибиотика. Пенициллин G вводят в ферментативный бульон бактерий, секретирующих ацилазы. Эти ферменты удаляют бензильную группу молекулы, в результате появляется 6-аминопенициллиновая кислота. Эта кислота – слабый антибиотик, но она очень удобна для присоединения боковых групп, которые повышают активность антибиотика.

Устойчивость к пенициллинам и цефалоспорином связана с наличием ферментов, так называемых  $\beta$ -лактамаз, которые широко распространены среди бактерий, актиномицетов, цианобактерий и дрожжей. Так, гены, кодирующие эти ферменты, находятся в составе плазмид, устойчивость к антибиотику может передаваться при переносе плазмид от одного бактериального штамма к другому. Исследовательские фирмы «Мерк, Шарп и Доум» открыли новый класс  $\beta$ -лактаманых антибиотиков, тиенамицины, продуцируемых *Streptomyces Caffleya*. Они чрезвычайно эффективны против грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также способны ингибировать  $\beta$ -лактамазы, что значительно повышает возможности этих антибиотиков. К ингибиторам  $\beta$ -лактомаз относятся также клавулановая и олевановая кислоты.

Новый антибиотик, аугментин, является комбинацией  $\beta$ -лактаманого антибиотика амоксициллина и клавулановой кислоты.

### **Разрушение пенициллина $\beta$ -лактамазой (пенициллиназой)**



### **Контрольные вопросы**

1. Дайте определение первичным метаболитам.
2. Приведите примеры химического получения аминокислот.
3. Опишите производство *L*-аминокислот микробиологическим синтезом.
4. Что может служить источниками азота для биосинтеза аминокислот?
5. Каким образом утилизируются серосодержащие соединения микробной клеткой?
6. Дайте определение антибиотикам. Какие стадии роста проходят микроорганизмы, производящие вторичные метаболиты?
7. Опишите строение и получение синтетических пенициллинов.

## РАЗДЕЛ 2. ОСНОВЫ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ

### 2.1. Методы генетического конструирования *in vivo*

Методы современной селекции включают генетическое конструирование, то есть совокупность приемов, с помощью которых сознательно изменяют генетическую программу микроорганизмов.

Генетическое конструирование *in vivo* – получение и выделение мутантов, и использование различных способов обмена наследственной информации живых микробных клеток.

Генетическое конструирование *in vitro* основано на применении генетической инженерии, которая предполагает манипуляции на выделенной из организмов ДНК. Следует отметить, что такое разделение условно, поскольку указанные методы взаимосвязаны и сегодня все больше переплетаются друг с другом.

Самовоспроизведение с изменением – это одно из основных свойств жизни. Термин «изменчивость» служит для обозначения различных понятий; как и большинство других терминов, он *полисемантичен* (многозначен). Юрий Александрович Филипченко различал два основных подхода к определению изменчивости.

*1. Изменчивость как состояние.* В этом значении термин «изменчивость» служит для обозначения отличий биологических объектов друг от друга в данный момент времени. Всегда существуют различия между частями одного организма, между разными организмами в популяции, между разными внутривидовыми группировками, между популяциями.

*2. Изменчивость как процесс.* В этом значении термин «изменчивость» служит для обозначения изменения биологического объекта во времени. В этом случае изменчивость отражает развитие особи, отличие потомков от родителей.

Любая наблюдаемая изменчивость является фенотипической. В свою очередь, фенотипическая, или общая изменчивость, включает три компонента:

– *Наследственная (генетическая, или генотипическая изменчивость)* – в значительной мере обусловлена влиянием генетических факторов. Например, в сходных условиях выращивается несколько сортов одного вида растений. Тогда различия между результатами эксперимента (например, урожайность) обусловлены генетическими особенностями каждого сорта. В основе генетической изменчивости лежит мутационная и комбинативная изменчивость.

– *Ненаследственная (модификационная) изменчивость* – в значительной мере обусловлена действием негенетических (*экзогенных*) факторов. Например, один сорт растений выращивается в разных условиях. Тогда различия между результатами эксперимента (например, урожайность) обусловлены влиянием условий выращивания растений.

– *Неконтролируемая (остаточная изменчивость)* – обусловлена неконтролируемыми (по крайней мере, в данном эксперименте) факторами.

Для разных признаков влияние генотипа и условий среды на общую фенотипическую изменчивость неодинаково. Например, окраска шерсти, жирномолочность у крупного рогатого скота, масса яиц у кур зависят, в основном, от особенностей породы (т.е. от генотипа) – эти признаки обладают высокой наследуемостью. Другие признаки: качество шерсти, общая удоимость у КРС, яйценоскость у кур – зависят, в основном, от условий выращивания и содержания. Эти признаки обладают низкой наследуемостью.

### **Мутагенез и методы выделения мутантов**

Генетическое изучение микробов, создавшее фундамент для современной селекции, стало возможным только тогда, когда были разработаны способы выделения клоновых культур или клонов. Клон – это генетически однородное потомство одной клетки.

Важнейшим методом селекции является отбор мутантов, т.е. организмов с измененными наследственными признаками.

Термин «мутация» (от лат. *mutatio* – изменение) долгое время использовался в биологии для обозначения любых скачкообразных изменений. Например, немецкий палеонтолог В. Вааген называл мутацией переход от одних ископаемых форм к другим. Мутацией называли также появление редких признаков, в частности, меланистических форм среди бабочек.

Современные представления о мутациях сложились к началу XX столетия. Например, российский ботаник Сергей Иванович Коржинский в 1899 г. разработал эволюционную теорию гетерогенеза, основанную на представлениях о ведущей эволюционной роли дискретных (прерывистых) изменений.

Таблица 12

	Положения мутационной теории Де Фриза	Современные уточнения
1	Мутации возникают внезапно, без всяких переходов.	Существует особый тип мутаций, накапливающийся в течение ряда поколений (прогрессирующая амплификация в интронах).
2	Успех в выявлении мутаций зависит от числа проанализированных особей.	Без изменений.
3	Мутантные формы вполне устойчивы.	При условии 100 %-ной пенетрантности и 100 %-ной экспрессивности.
4	Мутации характеризуются дискретностью (прерывистостью); это качественные изменения, которые не образуют непрерывных рядов, не группируются вокруг среднего типа (моды).	Существуют ликовые мутации, в результате которых происходит незначительное изменение характеристик конечного продукта.
5	Одни и те же мутации могут возникать повторно.	Это касается генных мутаций; хромосомные aberrации уникальны и неповторимы.
6	Мутации возникают в разных направлениях, они могут быть вредными и полезными.	Сами по себе мутации не носят адаптивный характер; только в ходе эволюции, в ходе отбора оценивается «полезность», «нейтральность» или «вредность» мутаций в определенных условиях; при этом «вредность» и «полезность» мутаций зависит от генотипической среды.

Однако наиболее известной стала мутационная теория голландского ботаника Хьюго (Гуго) Де Фриза (1901 г.), который ввел современное, генетическое понятие мутации для обозначения редких вариантов признаков в потомстве родителей, которые не имели этого признака.

Де Фриз разработал мутационную теорию на основе наблюдений за широко распространенным сорным растением – ослинником двулетним, или энотерой (*Oenothera biennis*). У этого растения существует несколько форм: крупноцветковые и мелкоцветковые, карликовые и гигантские. Де Фриз собирал семена с растения определенной формы, высевал их и получал в потомстве 1–2 % растений другой формы. В дальнейшем было установлено, что появление редких вариантов признака у энотеры не является мутацией; данный эффект обусловлен особенностями организацией хромосомного аппарата этого растения. Кроме того, редкие варианты признаков могут быть обусловлены редкими сочетаниями аллелей (например, белая окраска оперения у волнистых попугайчиков определяется редким сочетанием *aabb*).

В настоящее время принято следующее определение мутаций:

**Мутации – это качественные изменения генетического материала, приводящие к изменению тех или иных признаков организма.**

Организм, во всех клетках которого обнаруживается мутация, называется *мутантом*. Это происходит в том случае, если данный организм развивается из

мутантной клетки (гаметы, зиготы, споры). В ряде случаев мутация обнаруживается не во всех соматических клетках организма; такой организм называют *генетической мозаикой*. Это происходит, если мутации появляются в ходе онтогенеза – индивидуального развития. И, наконец, мутации могут происходить только в генеративных клетках (в гаметах, спорах и в клетках зародышевого пути – клетках-предшественницах спор и гамет). В последнем случае организм не является мутантом, но часть его потомков будет мутантами.

Различают «новые» мутации (возникающие *de novo*) и «старые» мутации. Старые мутации – это мутации, появившиеся в популяции задолго до начала их изучения; обычно о старых мутациях идет речь в генетике популяций и в эволюционной теории. Новые мутации – это мутации, появляющиеся в потомстве немутантных организмов ( $\text{♀ } AA \times \text{♂ } AA \rightarrow Aa$ ); обычно именно о таких мутациях идет речь в генетике мутагенеза.

Мутация – это случайное явление, т.е. невозможно предсказать, где, когда и какое изменение произойдет. Можно только оценить вероятность мутации в популяциях, зная фактические частоты определенных мутаций. Например, вероятность появления у кишечной палочки устойчивости к тетрациклину равна  $10^{-10}$  (одна десятиллиардная), поскольку лишь одна из 10 миллиардов клеток обнаруживает устойчивость к этому антибиотику (зато все потомство этой бактерии будет устойчивым к тетрациклину).

Установлено, что мутабельность гена (т.е. частота появления определенной мутации) зависит от природы гена: существуют гены, склонные к мутированию, и относительно стабильные гены.

Вероятность события – это математическая абстракция, математическое ожидание того, или иного события. Вероятность случайного события лежит в пределах от 0 до 1. Математическое ожидание определяется вне опыта (априорно), на основании дедуктивных рассуждений. Например, при подбрасывании монеты вероятность выпадения «орла» равна вероятности выпадения «решки» и равна 50 %, или 0,5:  $P_0 = P_p = 0,5$ .

Однако в биологии вероятность многих событий не может быть найдена вне опыта, например, вероятность рождения ребенка с синдромом Дауна. Тогда понятие математической вероятности подменяется понятием *статистической вероятности*. Статистическая вероятность определяется опытным путем (апостериорно). Численно *статистическая*, или *апостериорная*, *вероятность* события равна *относительной частоте* этого события. Например, на 700 новорожденных приходится один ребенок с болезнью Дауна. Тогда статистическая вероятность рождения ребенка с этим заболеванием равна  $1/700 \approx 0,0014$ .

Относительная частота колеблется около некоторого постоянного числа, которое и является математическим ожиданием события. Чем больше проведе-

но наблюдений, тем больше апостериорная вероятность приближается к математическому ожиданию данного события.

### **Общие свойства мутаций**

В настоящее время считается, что многие мутации не оказывают существенного влияния на жизнеспособность особей; такие мутации называются *нейтральными*. Нейтральность мутаций часто обусловлена тем, что большинство мутантных аллелей рецессивно по отношению к исходному аллелю. Однако существуют мутации, приводящие к гибели организма (летальные) или заметно снижающие его жизнеспособность (полуметальные). В определенных условиях мутации могут повышать жизнеспособность организмов (как в примере с серповидноклеточной анемией).

По способности передаваться при половом размножении различают *соматические* и *генеративные мутации*. Соматические мутации не затрагивают половые клетки и не передаются потомкам. В результате соматических мутаций возникают *генетические мозаики*. Генеративные мутации происходят в половых клетках и могут передаваться потомкам. При участии мутантных половых клеток образуются полностью мутантные организмы.

Мутации возникают как в аутосомах, так и в половых хромосомах; соответственно различают аутосомные мутации и мутации, сцепленные с полом. Кроме того, по возможности проявления в фенотипе различают доминантные, полудоминантные и рецессивные мутации (заметим, что подавляющее большинство мутаций является рецессивными).

Мутантный аллель может возвращаться в исходное состояние. Тогда первоначальная мутация называется прямой (например, переход  $A \rightarrow a$ ), а другая – обратной мутацией, или реверсией (например, обратный переход  $a \rightarrow A$ ).

### **Классификации мутаций**

Мутации классифицируют на основании различных критериев. Например, по уровню фенотипического проявления различают следующие мутации: *биохимические* (изменяется структура белков); *физиолого-биохимические* (изменяется обмен веществ); *онтогенетические* (изменяется характер онтогенеза); *физиолого-репродуктивные* (изменяются плодовитость, границы репродуктивного периода); *анатомо-морфологические* (изменяется внутреннее и внешнее строение организмов); *этологические* (поведенческие).

По уровню организации генетического материала, затронутого изменением, все мутации делят на *генные*, *хромосомные* и *геномные*.

Следует различать *мутации*:

1. Цитоплазматические – затрагивают внехромосомные генетические детерминанты.
2. Ядерные или хромосомные:
  - Изменение числа хромосом;

- Изменение числа и порядка расположения генов (перестройка хромосом или структурные изменения);
- Изменение индивидуальных генов (внутригенетические изменения).

В селекции микроорганизмов основное значение имеют последние два типа мутаций.

#### **Хромосомные перестройки:**

- Выпадение участков хромосомы (делеция);
- Удвоение (дупликация);
- Умножение (амплификация) числа отдельных генов или группы генов;
- Вставки участков хромосом в новые места (транспозиция);
- Обмен участков между хромосомами (транслокация);
- Изменение порядка расположения генов на хромосоме (инверсия).

**Внутригенные мутации** изменяют последовательность ДНК в пределах одного гена. По своим последствиям генные мутации делятся на две группы: *мутации без сдвига рамки считывания* и *мутации со сдвигом рамки считывания*.

**Мутации без сдвига рамки считывания** происходят в результате замены нуклеотидных пар, при этом общая длина ДНК не изменяется. В результате возможна замена аминокислот, однако из-за вырожденности генетического кода возможно и сохранение структуры белка.

#### **Пример. Замена аминокислотного остатка в составе полипептида (миссенс-мутации).**

В состав молекулы гемоглобина человека входят две  $\alpha$ -цепи ( $\alpha$ -цепь закодирована в 16-ой хромосоме) и две  $\beta$ -цепи ( $\beta$ -цепь закодирована в 11-ой хромосоме). В состав  $\beta$ -цепи входит 146 аминокислотных остатков, при этом в нормальной  $\beta$ -цепи шестым аминокислотным остатком является глутаминовая кислота. С участием нормальной  $\beta$ -цепи образуется нормальный гемоглобин – HbA. В нетранскрибируемой нити участка ДНК, кодирующего  $\beta$ -цепь, глутаминовая кислота закодирована триплетом ГАА. Если же в результате мутации в ДНК произойдет замена триплета ГАА на триплет ГТА, то на месте глутаминовой кислоты в молекуле гемоглобина в соответствии с генетическим кодом появится валин. В итоге вместо гемоглобина HbA появится новый гемоглобин – HbS. Такая замена всего лишь одного нуклеотида и одной аминокислоты приводит к развитию тяжелого заболевания – *серповидноклеточной анемии*.

На клеточном уровне эта болезнь проявляется в том, что эритроциты приобретают форму серпа и теряют способность к нормальному транспорту кислорода. Гомозиготы HbS/HbS умирают в раннем детстве. Зато гетерозиготы HbA/HbS характеризуются слабо измененными эритроцитами. При этом изменение формы эритроцитов значительно повышает устойчивость гетерозигот к малярии. Поэтому в тех регионах Земли, где свирепствует малярия (например, в Африке), отбор действовал в пользу гетерозигот. Таким образом, серповидноклеточная анемия – это пример относительности «полезности» и «вредности» мутаций.

**Пример. Мутация без замены аминокислотного остатка в составе полипептида (сеймсенс-мутации).** Если в нетранскрибируемой нити участка ДНК, кодирующего  $\beta$ -цепь гемоглобина, произойдет замена триплета ГАА на триплет ГАГ, то из-за избыточности генетического кода замены глутаминовой кислоты не произойдет. В итоге структура  $\beta$ -цепи гемоглобина не изменится, и в эритроцитах будет обнаруживаться только нормальный гемоглобин HbA. Таким образом, вовсе не любая генная мутация проявляется в фенотипе.

Особую группу образуют *ликовые мутации*, в результате которых происходит незначительное изменение характеристик конечного продукта. Это связано с заменой аминокислотных остатков в пассивной части белка: такие замены не оказывают существенного влияния на структуру и функции белка.

**Мутации со сдвигом рамки считывания (*фреймишифты*)** происходят в результате вставки или потери нуклеотидных пар, при этом общая длина ДНК изменяется. В результате происходит полное изменение структуры белка. Это могут быть выпадения или вставки одного или нескольких оснований, нарушающих порядок считывания гена в процессе трансляции. В клетках такого мутанта синтезируется неактивный белок с измененной последовательностью аминокислот. При транспозициях происходит замена какого-либо одного пурина (аденина или цитозина) на другой пурин или пиримидин соответственно. При трансверсиях пуриновые основания заменяются на одно из двух пиримидиновых и, наоборот, пиримидиновое основание – на одно из двух пуриновых.

Структура ДНК и белка до мутаций				
ДНК	А Т Г	Г Г Ц	А Т Ц	Г Г Ц
	Т А Ц	Ц Ц Г	Т А Г	Ц Ц Г
	↓	↓	↓	↓
мРНК	А У Г	Г Г Ц	А У Ц	Г Г Ц
	↓	↓	↓	↓
белок	метионин	глицин	изолейцин	глицин
Мутации и их последствия				
	вставка пары А – Т		потеря пары Ц – Г	
ДНК	А Т Г	А Г Г	Ц А Т	Г Г Ц
	Т А Ц	Т Ц Ц	Г Т А	Ц Ц Г
	↓	↓	↓	↓
мРНК	А У Г	А Г Г	Ц А У	Г Г Ц
	↓	↓	↓	↓
белок	метионин	аргинин	гистидин	глицин

Однако если после вставки пары нуклеотидов происходит потеря пары нуклеотидов (или наоборот), то аминокислотный состав белков может восстановиться. Тогда две мутации хотя бы частично компенсируют друг друга. Это явление называется *внутригенной супрессией*.

Мутации со сдвигом рамки считывания составляют ~ 80 % от всех генных мутаций. Вставки иначе называются *инсерциями*, а потери – *эксцизиями*. Процесс образования вставок называется *инсерционным мутагенезом*. Инсерционный мутагенез необходимо учитывать в генной инженерии.

**Нонсенс-мутации.** Особую группу генных мутаций составляют *нонсенс-мутации* с появлением стоп-кодонов. Нонсенс-мутации могут возникать как вследствие замен нуклеотидных пар, так и с потерями или вставками. С появ-

ление стоп-кодона синтез полипептида вообще обрывается. В результате могут возникать *нуль-аллели*, которым не соответствует ни один белок.

Кроме того, мутация в одном гене может подавлять мутации, происходящие в других (неаллельных) генах. Это явление называется *межгенной супрессией*.

**Дополнение. Некоторые мутации обладают плейотропным действием, т.е. приводят к изменению сразу нескольких признаков.**

**Пример.** Ароматические аминокислоты – триптофан, фенилаланин, тирозин – образуются из хоризмовой кислоты. Если некоторая мутация заблокирует хотя бы один этап синтеза хоризмовой кислоты, то клетка (организм) утрачивает способность к синтезу сразу трех аминокислот.

**Пример.** Один и тот же фермент (трансаминаза) контролирует синтез валина (из  $\alpha$ -кетоизовалериановой кислоты) и изолейцина (из  $\alpha$ -кето- $\beta$ -метилвалериановой кислоты). Если некоторая мутация нарушит функции этого фермента, то клетка (организм) утрачивает способность к синтезу сразу двух аминокислот.

## Методы выявления генных мутаций

Сложность выявления генных мутаций связана, во-первых, с рецессивностью большинства мутаций (вероятность их фенотипического проявления ничтожно мала), а во-вторых, с летальностью многих из них (мутанты не выживают).

Все множество методов выявления генных мутаций можно разделить на две группы: методы генетического анализа и биохимические методы.

**1. Методы генетического анализа** основаны на скрещивании возможных носителей мутации с тестерными линиями (линиями-анализаторами). Самый простой метод – это скрещивание носителей предполагаемой мутации с соответствующей рецессивно-гомозиготной линией, т.е. обычное анализирующее скрещивание. Однако этот метод не позволяет выявить неизвестные мутации, а также летальные мутации. Поэтому создаются специальные тестерные линии для учета летальных мутаций.

**2. Биохимические методы выявления мутаций** исключительно разнообразны и основаны на применении различных методик.

➤ Методики, основанные на выявлении определенных биохимических продуктов мутантных генов. Легче всего выявлять мутации по изменению активности ферментов или по утрате какого-либо биохимического признака. Например, у микроорганизмов на селективных питательных средах выявляются ауксотрофные формы, не способные синтезировать определенные вещества (по сравнению с нормальными, прототрофными формами).

➤ Методики, основанные на непосредственном выявлении измененных нуклеиновых кислот и белков с помощью гель-электрофореза в сочетании с другими методиками (блот-гибридизации, автордиографии).

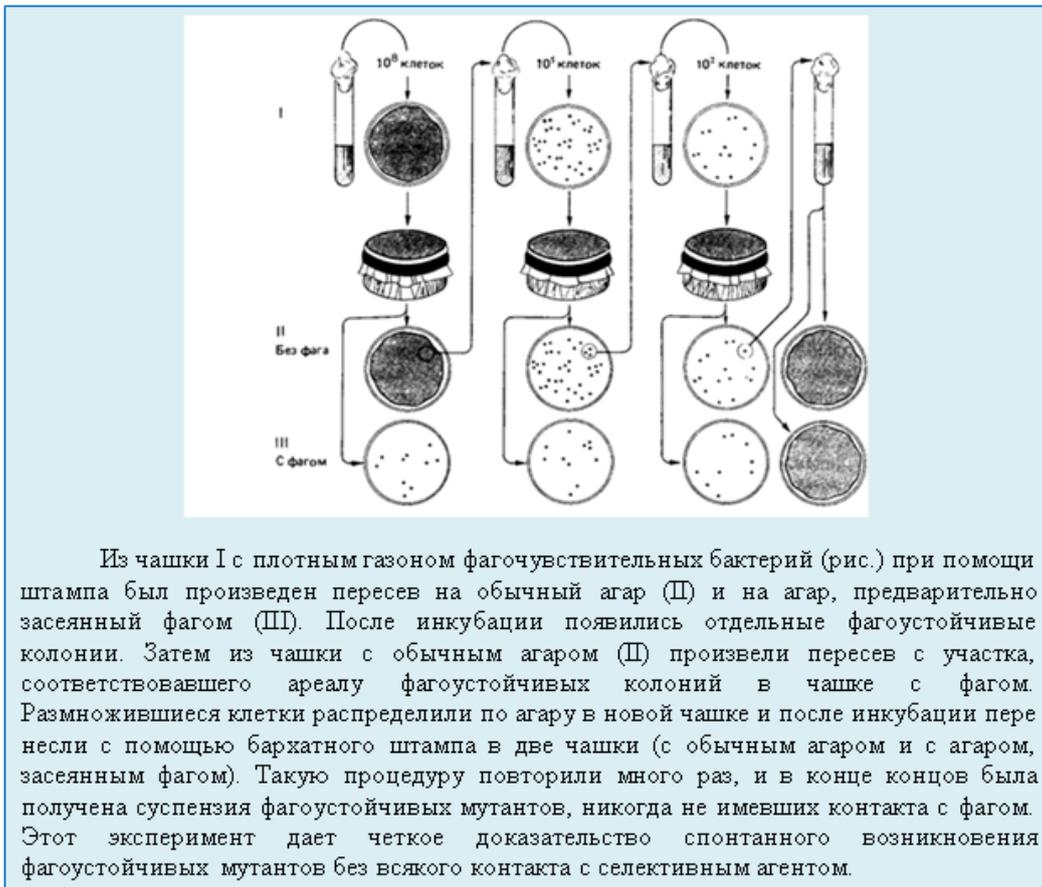
Если невозможно провести прямой отбор мутантов, исследуют колонии на индикаторных чашках, применяют тест-культуры микроорганизмов или перепечатывают колонии на различные среды, т.е. используют метод отпечатков или реплик.

**Индикаторные чашки** дают возможность различать мутанты по цвету колоний и проводить тестирование разнообразных фенотипов в больших популяциях. Такие чашки могут содержать среды с индикатором, выявляющим различие в рН между теми колониями, которые метаболизируют определенные углеводороды, и теми, которые не обладают такой способностью. Например, на агаре с трифенилтетразолином колонии, не сбраживающие лактозу, приобретают ярко-красный цвет, а сбраживающие остаются неокрашенными. Используют также специально приготовленные субстраты, распадающиеся с образованием красителя при их гидролизе ферментами, наличие которых тестируется в этих чашках. Иногда вносят субстраты, изменяющие прозрачность сред, и наблюдают образование вокруг колоний мутантов зон просветления.

**Тест-культуры.** В качестве тест-культур используют ауксотрофы, дающие рост в том случае, если мутанты выделяют в среду искомый метаболит, а также чувствительные культуры, рост которых подавляется, если мутант продуцирует антибиотик. По зоне роста или зоне ингибирования роста тест-культуры иногда можно составить представление о продуктивности мутанта.

#### **Метод отпечатков (реплик)**

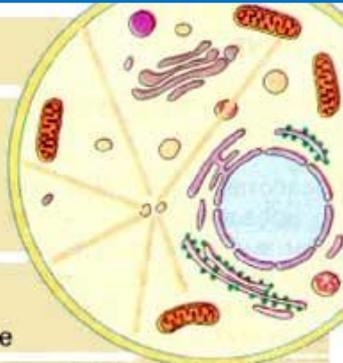
Согласно этому методу, чашки Петри засеивают с таким расчетом, чтобы на каждой из них выросло 50–200 колоний. Стерильный бархат или фильтровальную бумагу натягивают на металлический или деревянный цилиндр и закрепляют металлическим кольцом. Чашки Петри переворачивают и прикрепляют к бархату. Затем к этому же бархату (с отпечатками колоний на нем) прикрепляют чистые чашки с различными средами. После соответствующей инкубации на них образуются колонии в том же расположении, что и на исходной (матричной) чашке. Если матричная чашка содержит полноценную среду, то отпечатками на минимальные среды можно выявить ауксотрофные мутанты.



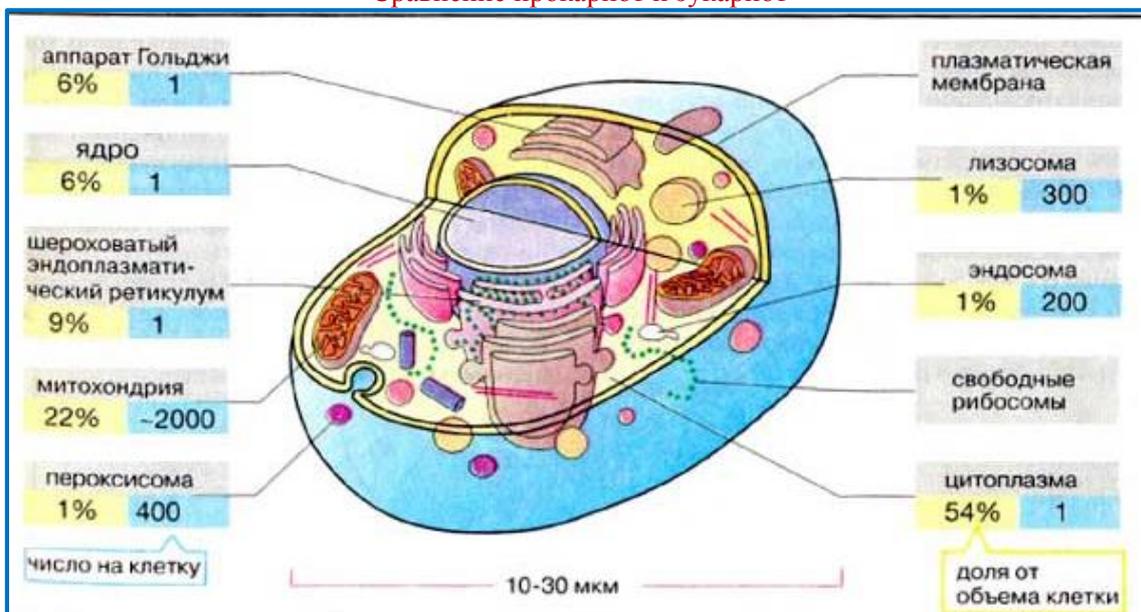
Различные модификации этого метода широко используются для выделения мутантов, чувствительных к различным физическим, химическим и биологическим агентам (температура, антибиотики, фаги и др.). Получение ауксотрофных мутантов с помощью метода отпечатков может быть облегчено, если обогащать ими популяцию клеток, используя пенициллин или его аналоги.

### 3. Гибридизация эукариотических микроорганизмов

Существующие на сегодня живые клетки подразделяются на два вида: **прокариоты** и **эукариоты**. **Эукариотами** называют клетки со сформировавшимся ядром, а **прокариотами** – с не сформировавшимся. К **прокариотам** относятся бактерии (архебактерии и цианобактерии), объединенные общим термином «дробянки». Клетка обычных дробянок покрыта целлюлозной оболочкой. Дробянки занимают определенное место в круговороте веществ в природе: цианобактерии синтезируют органические вещества; бактерии минерализируют органические вещества. Многие бактерии играют важную роль в медицине и ветеринарии как возбудители инфекций.

Прокариоты	Эукариоты
 1 - 10 мкм	
Организмы	
зубактерии архебактерии	грибы растения животные
Форма организма	
одноклеточные	одно- или многоклеточные
Органеллы, цитоскелет, аппарат клеточного деления	10-100 мкм
отсутствует	присутствует, сложный, специализированный
<b>DNA</b>	
маленькая, кольцевая, нет интронов, плазмиды	большая, в клеточных ядрах, много интронов
<b>RNA: синтез и созревание</b>	
простой, в цитоплазме	сложный, в ядрах
<b>Белки: синтез и процессинг</b>	
простой, связанный с синтезом RNA	сложный, в цитоплазме и полости rER
<b>Обмен веществ</b>	
анаэробный или аэробный, легко перестраивающийся	преимущественно аэробный
<b>Эндоцитоз и экзоцитоз</b>	
нет	различные формы

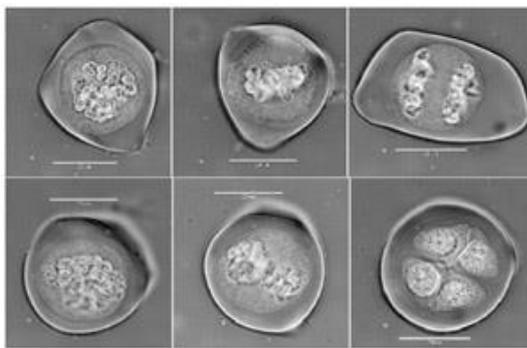
### Сравнение прокариот и эукариот



### Структура животной клетки

Генетическая рекомбинация перестраивает гены или части генов и позволяет объединять в одном геноме признаки двух организмов и более. В результате образуются гибридные или рекомбинантные клетки, сочетающие свойства родительских форм.

Появление эукариотической клетки было важнейшим эволюционным преобразованием (ароморфозом) в истории земной жизни. Одним из главных «достижений» древних эукариотических организмов стало возникновение настоящего полового процесса, то есть слияния двух гаплоидных (содержащих одинарный набор хромосом) клеток – гамет в диплоидную (содержащую двойной набор хромосом) клетку – зиготу. Чтобы жизненный цикл эукариот, обладающих половым процессом, мог продолжаться, должен был развиваться механизм, посредством которого из диплоидных клеток снова могли образовываться гаплоидные. Таким механизмом стал **мейоз** – особый вид клеточного деления, при котором число хромосом в дочерних клетках уменьшается вдвое по сравнению с родительской клеткой.



Мейоз, предшествующий образованию пыльцевых зерен у лука (слева направо и сверху вниз).

Фото с сайта <http://laurent.penet.free.fr>

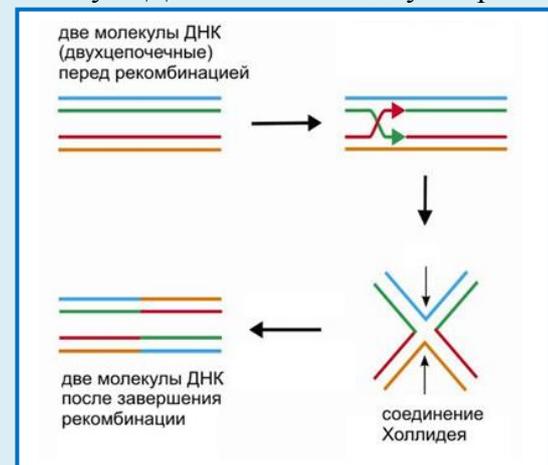
Появление мейоза – особого варианта клеточного деления, в результате которого число хромосом сокращается вдвое – было одним из важнейших эволюционных «достижений» первых эукариот. Механизм мейоза сложился из комбинации готовых «блоков»: механизмов митоза, рекомбинации и репарации ДНК. Ключевым событием стало формирование синаптонемного комплекса – особой белковой структуры, обеспечивающей попарное соединение и точное «выравнивание» хромосом.

Общепризнано, что мейоз произошел из **митоза** – «обычного» клеточного деления эукариот, в результате которого число хромосом остается прежним. Происхождение митоза само по себе было замечательным ароморфозом. Мейоз, по сути дела, является модифицированной версией митоза. Мейоз представляет собой два последовательных деления исходной диплоидной клетки и отличается от митоза только первым своим делением (см. схему). Отличие состоит в том, что хромосомы вступают в метафазу, соединенные попарно гомолог с гомологом (гомологичными называют хромосомы, содержащие одни и те же гены/локусы и полученные одна от отца, другая от матери). В метафазе I мейоза **центромеры** каждой из хромосом «униполярны», т.е. соединены белковыми нитями только с одним из двух полюсов **веретена деления**. В ходе митоза (а также в ходе второго деления мейоза) хромосомы вступают в метафазу поодиночке и нити веретена деления присоединяются к каждой хромосоме с двух сторон. Именно благодаря указанным особенностям первого деления мейоза и

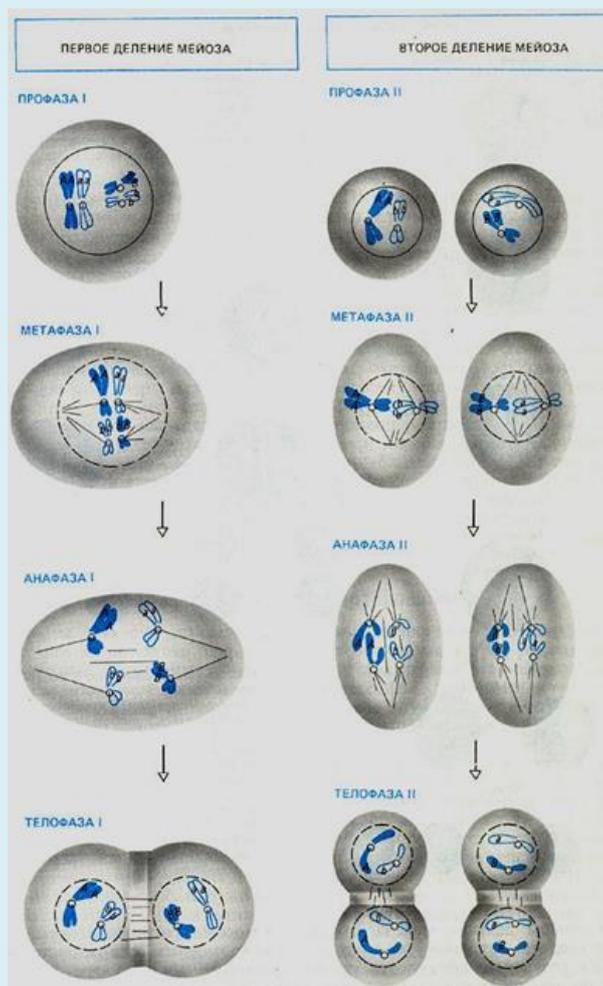
обеспечивается уменьшение числа хромосом: к полюсам клетки расходятся не сестринские хроматиды, а гомологичные хромосомы, по одной из каждой пары (см. схему). Эти ключевые особенности первого деления мейоза развились на основе одного и того же ароморфоза – возникновения так называемого синаптонемного комплекса (СК). Механизм мейоза был «собран» из готовых блоков (как это часто бывает в эволюции) – разумеется, с некоторыми модификациями и новшествами. Одним из этих исходных блоков стал уже имевшийся к тому времени у эукариот механизм митоза, другим – механизм репарации (починки повреждений) ДНК, основанный на гомологичной рекомбинации. Суть процесса в том, что поврежденный участок одной молекулы ДНК заменяется его неповрежденной копией, взятой из другой (гомологичной) молекулы ДНК.

Чтобы «развести» гомологичные хромосомы к разным полюсам клетки, в ходе мейоза используется веретено деления, «унаследованное» от митоза. Но чтобы распределение хромосом по дочерним клеткам прошло без ошибок, гомологичные хромосомы необходимо сначала сгруппировать попарно. Для этого используется механизм гомологичной рекомбинации, точнее, одна из деталей этого механизма – образование так называемого соединения Холлидея.

**Дополнение.** Упрощенная схема одного из вариантов гомологичной рекомбинации (обмена участками между гомологичными молекулами ДНК) с образованием соединения Холлидея. Показаны две двухцепочечные молекулы ДНК. Тут важно не перепутать: каждая молекула ДНК состоит из двух параллельных цепей нуклеотидов (двойная спираль); в состав



одной хроматиды входит одна молекула ДНК; каждая хромосома (вплоть до анафазы II) состоит из двух хроматид. Соответственно, каждая пара гомологичных хромосом (например, в метафазе I) состоит из ДВУХ хромосом, ЧЕТЫРЕХ хроматид, ЧЕТЫРЕХ молекул ДНК, ВОСЬМИ нуклеотидных цепочек. Рекомбинация происходит между хроматидами отцовской и материнской хромосом. На этом рисунке показана рекомбинация у одного из вирусов, у эукариот во время мейоза все несколько иначе и сложнее.



**Схема мейоза.** На рисунке показан мейоз клетки, у которой число хромосом в одинарном (гаплоидном) наборе равно двум. Диплоидная клетка, соответственно, имеет 4 хромосомы (две получены от отца – например, синие; две – от матери – допустим, белые). Перед началом деления (митоза или мейоза) каждая хромосома удваивается. Теперь она состоит из двух сестринских хроматид. В профазе I мейоза гомологичные хромосомы объединяются попарно и обмениваются участками (кроссинговер). В метафазе I мейоза гомологичные хромосомы по-прежнему сгруппированы попарно. В нашем случае получилось 2 пары, в каждой по две гомологичные хромосомы и по 4 хроматиды. Затем гомологичные хромосомы расходятся к полюсам клетки (анафаза I), и, наконец, исходная диплоидная клетка (с 4 хромосомами) разделяется на две гаплоидные (по 2 хромосомы в каждой). Все хромосомы по-прежнему состоят из двух хроматид. Во время второго деления мейоза каждая из этих гаплоидных клеток делится еще раз. При этом в метафазе II хромосомы уже не группируются попарно (да им теперь и не с кем – нет подходящих пар-гомологов), а стоят поодиночке. В анафазе II сестринские хроматиды отделяются друг от друга и расходятся к полюсам. В итоге получается 4 гаплоидные клетки, в каждой по 2 хромосомы, каждая хромосома состоит из одной хроматиды. Второе деление мейоза, по сути дела, мало чем отличается от «обычного» клеточного деления – митоза.

## **Починка разрывов ДНК – одна из основ мейоза**

Механизмы репарации и рекомбинации ДНК – очень древние, они должны были возникнуть еще на заре жизни.

Жизненный цикл древних эукариот (как и многих прокариот), вероятно, состоял из двух фаз и двух соответствующих типов метаболизма: 1) вегетативная фаза (условия благоприятны, клетки размножаются митозом); 2) фаза споруляции (условия стали неблагоприятными, клетки превращаются в споры). У низших эукариот (например, у дрожжей) перед споруляцией происходит мейоз и из получившихся гаплоидных клеток образуются споры.

Становление мейоза в ходе эволюции, также как и сам мейоз в жизненном цикле современных организмов, начинается с репарации повреждений (разрывов) ДНК. Разрывы эти в начале мейоза возникают не сами собой – их создает специальный фермент, эндонуклеаза SPO11. Этот фермент является модификацией другого белка – ДНК-топоизомеразы VI, унаследованной эукариотами от своих прокариотических предков – архей.

Клетка начинает «чинить» разорванные молекулы ДНК при помощи древнего механизма гомологичной рекомбинации. А для этого нужно объединить попарно гомологичные молекулы ДНК (чтобы использовать неповрежденные участки одной молекулы в качестве «матрицы» для исправления повреждений в другой молекуле). На этом и основано попарное объединение хромосом в профазе I мейоза.

Если после слияния клеток ядра не сливаются, то образуются формы со смешанной цитоплазмой и ядрами разного происхождения – гетерокарионы (свойственны мицелиальным грибам, например, пенициллам).

При размножении полученного ядра при гибридизации гетерозиготного диплоида или гетерокариона происходит расщепление – появление в потомстве форм, у которые обнаружены не только доминантные, но и рецессивные признаки родителей.

## **Внехромосомные факторы наследственности**

Внехромосомные факторы наследственности входят в состав многих микроорганизмов, особенно бактерий. Они представлены плазмидами, транспозонами и Is-последовательностями (англ. *insertion* – вставка, *sequence* – последовательность), которые являются молекулами ДНК, отличающимися друг от друга молекулярной массой, объемом закодированной в них информации, способностью к автономной репликации и другими признаками.

Плазмиды, транспозоны и Is-последовательности не являются генетическими элементами, жизненно необходимыми для бактериальной клетки, поскольку они не несут информации о синтезе ферментов, участвующих в пластическом или энергетическом метаболизме. Вместе с тем они могут придавать

бактериям определенные селективные преимущества, например резистентность к антибиотикам.

Плазмиды физически либо не связаны с хромосомой (автономное состояние), либо встроены в ее состав (интегрированное состояние). В автономном состоянии они самостоятельно реплицируются. Транспозоны и Is-последовательности во всех случаях связаны с хромосомой и не способны к самостоятельной репликации.

### **Плазмиды и конъюгация у бактерий**

Основным и обязательным генетическим элементом прокариотических клеток является хромосома, организованная в виде репликона, т.е. структуры, способной к самостоятельной репликации.

Плазмиды несут две функции – *регуляторную* и *кодирующую*. Первая состоит в компенсации нарушений метаболизма ДНК клетки хозяина. Например, при интегрировании плазмиды в состав поврежденного бактериального генома, не способного к репликации, его функция восстанавливается за счет плазмидного репликона.

Кодирующая функция плазмид состоит во внесении в бактериальную клетку новой информации, о которой судят по приобретенному признаку, например образованию пилей (F-плазида), резистентности к антибиотикам (R-плазида), выделению бактериоцинов (Col-плазида) и т.д.

Переход плазмиды в автономное состояние и реализация записанной в ней информации часто связаны с индуцирующими воздействиями внешней среды. В некоторых случаях продукты плазмидных генов могут способствовать выживанию несущих их бактерий. Самостоятельная репликация плазмидной ДНК способствует ее сохранению и распространению в потомстве. Встраивание плазмид, также как и профагов, происходит только в гомологичные участки бактериальной хромосомы, в то время как Is-последовательностей и транспозонов – в любой ее участок.

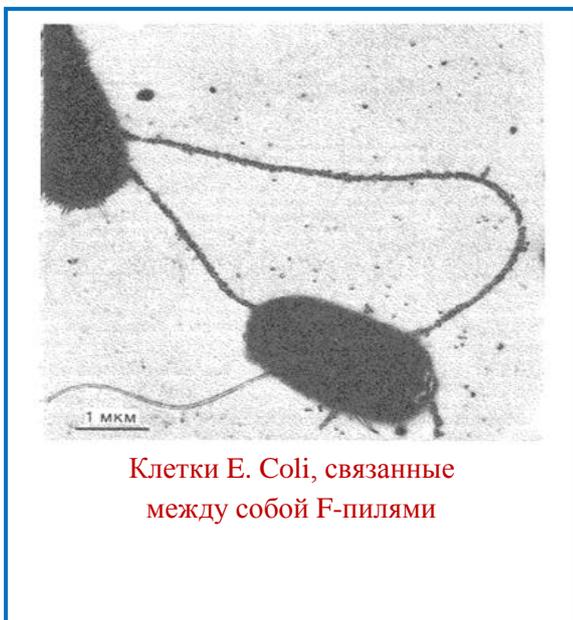
Хромосома *E. Coli* и, вероятно, другие бактерии представляют собой кольцевую молекулу ДНК. Её репликация, инициируемая на специфическом участке *oriC*, направлена в обе стороны и завершается в определенной точке – терминусе (*terC*). Окончание репликации хромосомы, по-видимому, является сигналом для начала клеточного деления. Наряду с хромосомой в бактериальной клетке может присутствовать дополнительный генетический материал в виде плазмидной или фаговой ДНК. Плазмиды (внехромосомные генетические элементы) – репликоны, стабильно наследуемые во внехромосомном состоянии. Молекулы плазмидных ДНК могут обнаруживаться как в кольцевой, так и в линейной двуцепочечной формах, а недавно – в клетке и кольцевой одноцепочечной форме. Нативная плазмидная ДНК, выделяемая из клеток с помощью

мягких методов, представляет собой сверхскрученные ковалентно замкнутые кольцевые молекулы. Если происходит разрыв одной нити ДНК, возникают открытые кольцевые, или релаксированные, молекулы. При двунитевых разрывах образуются линейные формы. Огромные молекулы ДНК хромосом при разрушении клеток обычно многократно разрываются и образуют линейные фрагменты.

Важнейшими компонентами плазмидного репликона являются детерминанты, регулирующие его репликацию:

- Последовательность нуклеотидов, на которой происходит инициация репликации (*oriV*). Некоторые плазмиды могут содержать два и даже три таких участка.
- Структурный ген (гены), контролирующий репликацию (*rep*).
- Генетические детерминанты, негативно контролирующие количество плазмидных копий (*cop*).
- Генетические детерминанты, обеспечивающие распределение плазмидных копий между дочерними клетками (*par*).

Процесс генетического обмена, сопровождаемый переносом генетической информации от клетки – донора к клетке реципиенту, которая осуществляется при непосредственном контакте клеток между собой – **конъюгация**.



Клетки *E. Coli*, связанные между собой F-пилями

**Конъюгация** – форма полового процесса. У бактерий – однонаправленный перенос ДНК из одной контактирующей клетки в другую.

**Фактор *F***. При исследовании процесса скрещивания бактерий выяснилось, что способность клетки быть донором связана с наличием особого фактора, который при конъюгации передается из одной клетки в другую – полового фактора *F* (от *fertility* – плодовитость). Клетки, не содержащие фактора *F* (клетки *F*<sup>-</sup>), могут функционировать только как реципиенты. При конъюгации, т.е. при прямом контакте

между клетками, частота передачи фактора *F* близка к 100 %. Таким образом, клетки-реципиенты в результате конъюгации превращаются в потенциальных доноров; при этом хромосомные признаки еще не передаются.

Фактор *F* представляет собой кольцевую двухцепочечную молекулу ДНК с массой  $45 \cdot 10^6$  Да. В качестве внехромосомного автономно реплицируемого элемента ДНК ее следует отнести к **плазмидам**. Эта молекула содержит гены,

ответственные за процесс конъюгации, в том числе гены, детерминирующие особые структуры клеточной поверхности, например половые волоски, или **F-пили**, необходимые для конъюгации. По всей вероятности, они служат для взаимного узнавания при контакте между клеткой-донором и клеткой-реципиентом и делают возможным образование конъюгационного мостика, по которому ДНК переходит внутрь клетки-реципиента. Пока не ясно, происходит ли такая «инъекция» ДНК через сами F-пили.

Система конъюгативного переноса такой плазмиды, как F-фактор, которая изучена лучше других, конструируется более чем 20 генами, занимающими область протяженностью в 33 тыс. пар оснований, что соответствует ~ 1/3 всей плазмидной ДНК. Эта система обеспечивает осуществление 2 основных этапов процесса конъюгации: во-первых, образование скрещивающихся пар и, во-вторых, перенос и репликацию ДНК. Для образования скрещивающихся пар совершенно необходимы половые ворсинки – пили, которые формируются на поверхности донорных клеток. Образование пилей контролируется 12 генами, входящими в состав большого *tra*-оперона, причем ген *traA* определяет синтез белка-предшественника пилина, из которого строятся пили. Другие *tra*-гены участвуют в стабилизации скрещивающихся пар.

Некоторые плазмиды обладают способностью создавать межклеточные контакты, через которые они и переходят из одной клетки в другую. Образование контактов между донором и реципиентной клеткой обеспечивается конъюгативными свойствами плазмид, а сам перенос ДНК – мобилизационными. Большинство плазмид, которые используются при работе с рекомбинантной ДНК, не обладают конъюгативными функциями и поэтому не могут переходить в реципиентные клетки путем конъюгации. Однако проникновение в клетку некоторых плазмидных векторов все-таки происходит при наличии в этой клетке второй плазмиды, обладающей конъюгативными свойствами.

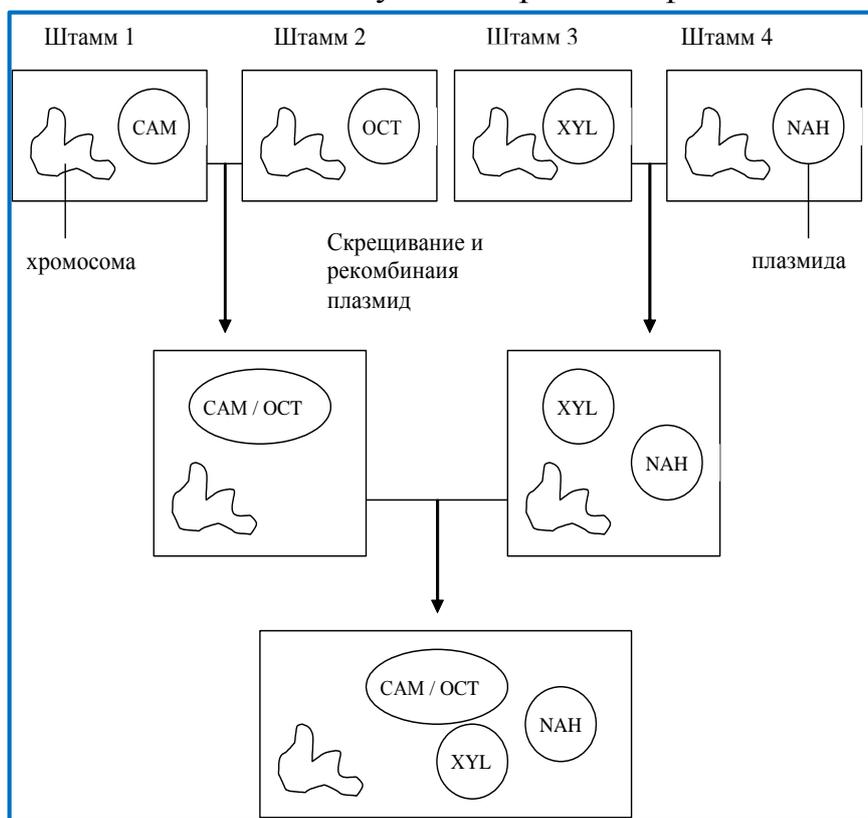
Таким образом, введя в клетку, несущую мобилизуемый плазмидный вектор, плазмиду с конъюгативными функциями, можно трансформировать клетки – реципиенты, с трудом поддающиеся трансформации другими способами.

Неконъюгативные плазмиды не содержат детерминантов, придающих бактериальным клеткам свойства генетических доноров, и поэтому они не способны самостоятельно передаваться от одних клеток к другим. Однако такие плазмиды могут быть перенесены в реципиентные клетки с помощью конъюгативных плазмид. Перенос неконъюгативных плазмид конъюгативными называется мобилизацией. При этом неконъюгативная плаزمида является мобилизуемой, а конъюгативная – мобилизующей.

Из клетки донора в клетку реципиента переносится только одна нить плазмидной ДНК, начиная со специфического сайта *oriT*, где образуется одно-

нитчатый разрыв. Затем происходит разделение нитей ДНК как в клетке донора, так и в клетке реципиента. Завершающий этап этого процесса связан с образованием кольцевых структур плазмидных ДНК.

Ярким примером создания микроорганизма с помощью переноса природных плазмид служит получение штамма *Pseudomonas Putida*, способного утилизировать большинство основных углеводов нефти.



Получение штамма *Pseudomonas Putida*

Многие псевдомонады несут плазмиды, каждая из которых кодирует ферменты, необходимые для расщепления одного-единственного класса углеводов. Плазмида OCT обуславливает расщепление октана, гексана и декана, плазмиды XYL – ксилола и толулола, CAM – камфоры, NAH – нафталина. Две из этих плазмид, CAM и NAH, являются конъюгативными, а две другие, OCT и XYL, мобилизуются указанными плазмидами. В результате последовательных скрещиваний был получен штамм *Ps. Putida*, несущий плазмиды XYL и NAH и гибридную плазмиду, вероятно, коинтеграт, содержащий плазмиды OCT и CAM. Такая мультиплазмидная бактерия энергично растет, усваивая неочищенную нефть, поскольку она утилизирует гораздо больше углеводов, чем любая бактерия с одной плазмидой. На этот штамм был выдан первый в истории США патент, защищающий конструирование и использование живого организма.

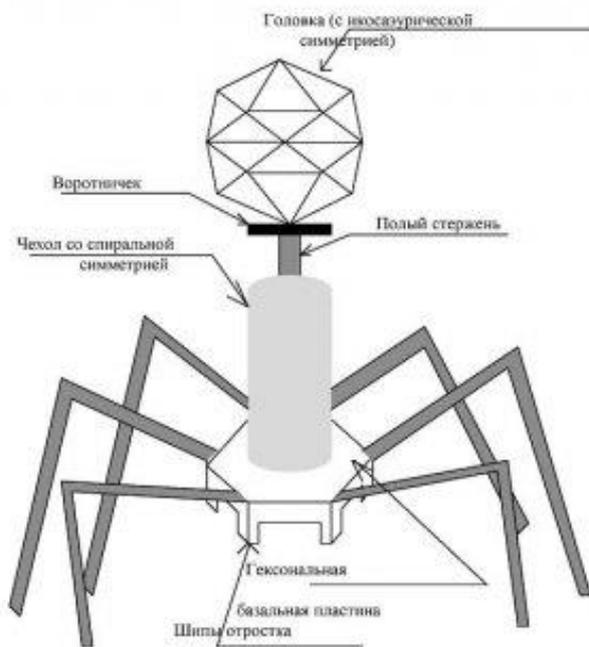
## Фаги и трансдукция

**Бактериофаги** (фаги) – вирусы бактерий. Как и все вирусы, они являются существами доклеточного уровня организации, способны проникать в живые клетки и только в них воспроизводиться. В большинстве случаев фаговые частицы (вирионы) состоят лишь из ДНК (или РНК) и белка, образующего оболочку (головку, или капсид) вокруг нуклеиновой кислоты и хвостовой отросток. Обычно у ДНК содержащих фагов нуклеиновая кислота двуцепочечная, но в некоторых случаях бывает и одноцепочечная. У всех известных РНК-содержащих фагов нуклеиновая кислота является одноцепочечной.

Спустя 25 лет после открытия вируса, канадский ученый Феликс Д'Эрел, используя метод фильтрации, открыл новую группу вирусов – поражающих бактерии. Они так и были названы бактериофагами (или просто фагами).

### Жизненный цикл бактериофагов

Жизненный цикл фага начинается в момент соприкосновения фаговой частицы с чувствительной клеткой.



Фаг прикрепляется своим отростком к клеточной оболочке. По-видимому, с помощью фермента, который имеется в отростке или в результате механического прокола, он разрушает небольшой участок клеточной мембраны и через образовавшееся отверстие вводит свою хромосому в клетку. В бактериальной клетке происходит многократная репликация хромосомы фага и синтез под контролем фаговых генов белков головки и отростка. Затем образуются новые

фаговые оболочки и в них пакуются фаговые хромосомы, так что сразу возникает большое количество (от 100 до 1000) фаговых частиц. Цикл заканчивается лизисом бактериальной клетки и выходом зрелых фаговых частиц в окружающую среду.

1) Фаг приближается к бактерии, и хвостовые нити связываются с рецепторными участками на поверхности бактериальной клетки.

2) Хвостовые нити изгибаются и «заякоривают» шипы и базальную пластинку на поверхность клетки; хвостовой чехол сокращается, заставляя полый стержень входить в клетку; этому способствует фермент – лизоцим, который находится в базальной пластинке; таким образом ДНК вводится внутрь клетки.

3) ДНК фага кодирует синтез ферментов фага, используя для этого более синтезирующий аппарат (рибосомы и т.п.) хозяина.

4) Фаг тем или иным способом инактивирует ДНК хозяина, а фермент фага совсем расщепляет ее; ДНК фага подчиняет себе клеточный аппарат.

5) ДНК фага реплицируется и кодирует синтез новых белков.

6) Новые частицы фага, образуемые в результате спонтанной самосборки белковой оболочки вокруг фаговой ДНК; под контролем ДНК фагов синтезируется лизоцим.

7) Лизис клетки, т.е. клетка лопаются под воздействием лизоцима; высвобождается около 200–1000 новых фагов; фаги индуцируют другие клетки.

Жизненный цикл фага составляет 30 минут.

Вирулентные фаги всегда лизируют зараженные им бактерии и имеют только один путь развития – литический цикл. Умеренные фаги могут вести себя по-разному: после проникновения в клетку хромосома фага либо вовлекается в литический цикл, либо вступает с клеткой-хозяином в своего рода симбиотические отношения – превращается в профаг и передается всему потомству данной клетки. Бактерии, которые содержат профаг, называются лизогенными. Профаг может находиться в клетке в виде автономной плазмиды, реплицирующейся синхронно с хромосомой бактерии, либо в интегрированном в хромосому состоянии.

Почти каждый известный в настоящее время вид бактерии является хозяином одного или нескольких вирулентных или умеренных фагов. Значение фагов для микробиологической промышленности определяется не только тем, что они могут серьезно нарушить процессы ферментации в результате фаголизиса производственных культур. Фаги являются важным инструментом генетического анализа и конструирования штаммов бактерии генетической инженерии.

**Трансдукция** – это перенос генетической информации от клетки донора к клетке-реципиенту, который осуществляется фагом.

Это явление основано (1952 г. Циндер и Ледерберг) на том, что в процессе размножения фагов в бактериях иногда образуются частицы, которые наряду с фаговой ДНК или вместо нее содержат фрагменты бактериальной ДНК. Такие частицы называют трансдуцирующими. По морфологии и адсорбционным свойствам они ничем не отличаются от обычных фаговых вариантов, но при заражении ими новых клеток они передают им генетические детерминанты предыдущего хозяина. Таким образом, чтобы осуществить трансдукцию необходимо размножить фаг на клетках штамма-донора, а затем заразить им клетки штамма-реципиента. Отбор рекомбинантов, которые называются здесь трансдуктантами, проводят на селективных средах, где не могут расти исходные реципиентные клетки.

## Слияние протопластов

В последние годы в генетико-селективной работе все чаще используются микробиологические протопласты. С помощью слияния протопластов можно получать генетические рекомбинанты у тех видов и штаммов микроорганизмов, у которых не обнаружены собственные системы обмена наследственной информации и которые в естественных условиях никогда не скрещиваются между собой. Трансформация протопластов, по-видимому, является универсальным способом введения молекул ДНК в клетки бактерий, аминомицетов, дрожжей и грибов.

Термин «протопласты» применяют для обозначения структур, которые образуются после удаления клеточной стенки у клеток растений и микроорганизмов.

Для получения протопластов у микроорганизмов используют несколько методов:

- подавление синтеза клеточной стенки структурными аналогами ее компонентов и антибиотиками (пенициллин, высокие концентрации аминокислот глицина);
- ферментативный лизис клеточной стенки (фермент лизоцим, который растворяют пептидогликан).

Протопласты, имеющие только эластичную цитоплазматическую мембрану, сохраняют целостность и жизнеспособность в гипертонических средах, где они приобретают сферическую форму. В гипотонических растворах, например, в дистиллированной воде, происходит лизис протопластов, и это является одним из показателей их образования. Поэтому получение протопластов и все манипуляции с ними проводят в присутствии осмотических стабилизаторов, которые добавляют в концентрациях (0,2–0,5 моль), компенсирующих внутриклеточное давление. В качестве осмотических стабилизаторов используют минеральные соли (KCl, NaCl, NH<sub>4</sub>Cl, NaNO<sub>3</sub>), соли органических кислот (сукцинат натрия), многоатомные спирты (маннитол, сорбитол), углеводы (сахароза, рамноза, ксилоза и др.). Природа и концентрация осмотического стабилизатора могут влиять как на эффективность образования протопластов, так и на их стабильность.

Использование протопластов в генетических экспериментах стало возможным после того, как было обнаружено, что эффективным индуктором их слияния является полиэтиленгликоль.

В опыты берут генетически маркированные штаммы микроорганизмов, часто несущие мутации ауксотрофности и устойчивости к антибиотикам. Перед обработкой полиэтиленгликолем суспензии протопластов исходных штаммов смешивают и осаждают центрифугированием, что повышает частоту слияния.

Затем смесь ресуспендируют и высевают на гипертонические среды. Продукты слияния протопластов называются фузантами.

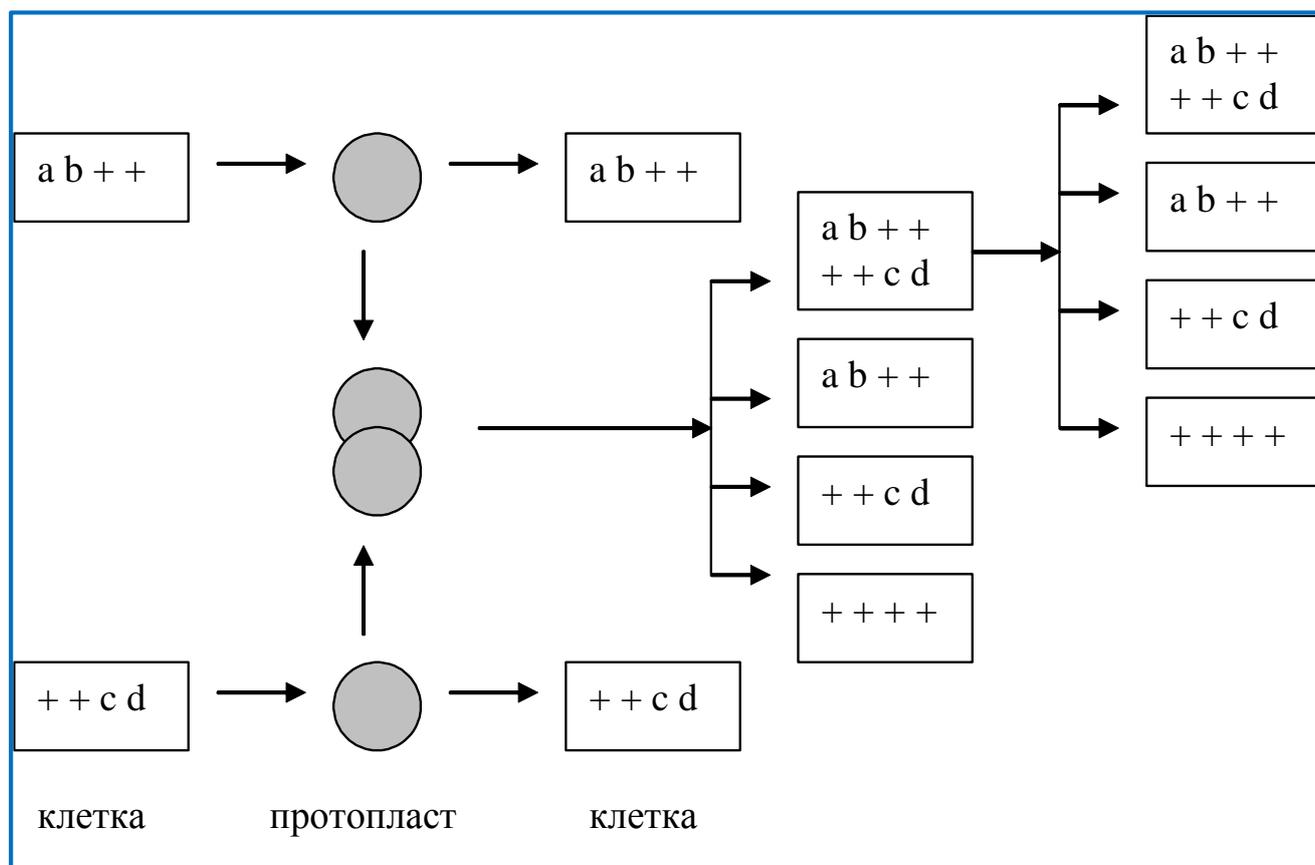


Схема слияния протопластов

При прямой селекции фузанты отбирают сразу на селективных гипертонических средах, где не могут ревертировать (возвратиться к клеточной форме с характерной морфологией) протопласты родительских штаммов. При слиянии протопластов объединяются и взаимодействуют целые геномы, а также все компоненты цитоплазм родительских клеток. При непрямой селекции смесь протопластов, обработанную полиэтиленгликолем, высевают на неселективную гипертоническую среду, а для отбора фузантов выросшие колонии переносятся на селективные среды, не содержащие осмотического стабилизатора. Специфика отбора рекомбинантов, возникающих при слиянии протопластов, состоит в том, что необходимо создать подходящие условия не только для их селекции, но и для реверсии к их клеточной форме.

Следует указать на ряд особенностей метода слияния протопластов как способа генетического обмена. В отличие от конъюгации, трансдукции и трансформации у бактерий, при которых в реципиентную клетку попадает лишь часть наследственного материала донора, при слиянии протопластов объединяются и взаимодействуют целые геномы, а также все компоненты цитоплазм родительских клеток. Кроме того, в акте слияния может участвовать бо-

лее двух протопластов из разных штаммов и в результате сразу появляются рекомбинанты, наследующие признаки трех и более родителей.

### **Контрольные вопросы**

1. Перечислите виды мутаций и хромосомных перестроек.
2. Опишите метод индикаторных чашек и метод тест-культур.
3. Опишите метод отпечатков
4. Что собой представляет гибридизация эукариотических микроорганизмов?
5. Какие требования предъявляются к плазмидам, используемым в качестве векторов, как протекает конъюгация у бактерий?
6. Опишите жизненный цикл фага.
7. Как проходит слияние протопластов?

## 2.2. Методы генетического конструирования *in vitro*

Включают работу с рекомбинантной ДНК. Суть этой технологии заключается в воссоединении фрагментов ДНК *in vitro*, т.е. в «пробирке» с последующим введением новых («рекомбинантных») генетических структур в живую клетку.

Т.к. с химической точки зрения ДНК всех организмов однотипна, то *in vitro* возможно воссоединение фрагментов ДНК из любых организмов. В этом смысле рекомбинация *in vitro* отличается от обычной генетической рекомбинации, которая требует гомологи ДНК и, как правило, осуществляется в пределах одного или близкородственных видов.

Техника генетической инженерии впервые позволила получать индивидуальные фрагменты ДНК в достаточных количествах из гомологов любой степени сложности. В сочетании с методами быстрого определения последовательности оснований в ДНК эта техника впервые открыла исследователям путь к выяснению строения генов высших организмов, в том числе и человека.

**Основные принципы:** сначала нужно понять, что главным философским итогом развития современной биологии являлось выявление удивительной универсальности жизни на молекулярном уровне. Во всех живых системах носители генной информации – нуклеиновые кислоты (ДНК или РНК), причем на языке универсального генетического кода. Молекула АТФ – общий переносчик энергии, 20 аминокислот, из которых состоят белки всех живых организмов. Особенно важно, что воспроизведение макромолекул в живых системах также подчиняется общим принципам.

Сегодня вряд ли кого-либо удивит такими понятиями, как наследственность, геном, ДНК, нуклеотиды. Все знают о двойной спирали ДНК и что именно она ответственна за формирование всех признаков организма. Но не все знают о принципах ее устройства и подчиненности основным правилам Чаргаффа.

Группа ученых Колумбийского университета в Нью-Йорке во главе с Э. Чаргаффом в 1950–1952 гг. занималась хроматографией ДНК. Что в ее состав входит четыре нуклеотида, уже было известно, но о ее спиральной структуре еще никто не знал. Многократные исследования показали, что в молекуле ДНК количество пуриновых оснований равно количеству пиримидиновых. А точнее, количество тимина всегда равно количеству аденина, а количество гуанина соответствует количеству цитозина. Эта равенность азотистых оснований – правило Чаргаффа для дезоксирибонуклеиновой и рибонуклеиновой кислот.

**Значение в биологии.** Именно это правило стало той опорой, на которую ориентировались Уотсон и Крик при выведении структуры молекулы ДНК. Их

двухцепочечная спирально закрученная модель из шариков, проволоки и фигурок объяснила это равенство. Другими словами, правила Чаргаффа заключаются в том, что тимин соединяется с аденином, а гуанин – с цитозином. Именно это соотношение нуклеотидов идеально укладывалось в пространственную модель ДНК, предложенную Уотсоном и Криком. Открытие структуры молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты подтолкнуло науку к открытиям более широкого уровня: принципов изменчивости и наследственности, биологического синтеза ДНК, объяснения эволюции и ее механизмов на молекулярном уровне.

**Правила Чаргаффа в чистом виде.** Современная наука формулирует данные фундаментальные положения следующими тремя постулатами:

Количество аденина соответствует количеству тимина, а цитозина – гуанину:  $A = T$  и  $G = C$ .

Количество пуринов всегда равно количеству пиримидинов:  $A + G = T + C$ .

Количество нуклеотидов, которые содержат в положении 4 пиримидинового и 6 пуринового оснований, равно количеству нуклеотидов, что содержат в этих же положениях оксогруппы:  $A + G = C + T$ .

В 1990-х гг. с открытием технологий секвенирования (определение последовательности нуклеотидов в длинных участках) ДНК правила Чаргаффа получили свое подтверждение.

**Количественное соотношение нуклеотидов в молекуле ДНК известны в виде правил Чаргаффа**

**Правила Чаргаффа**

Purines = Pyrimidines

$[A] + [G] = [T] + [C] = 50\%$

- $\Sigma A = \Sigma T$  или  $\Sigma A / \Sigma T = 1$
- $\Sigma G = \Sigma C$  или  $\Sigma G / \Sigma C = 1$
- $\Sigma(A + G) = \Sigma(T + C)$  или  $\Sigma(A + G) / \Sigma(T + C) = 1$
- Количество комплементарных оснований  $A + T$  и  $G + C$  у разных видов живых организмов различно
- Отношение  $\Sigma(T + C) / \Sigma(A + G)$  является важнейшей характеристикой ДНК, как показатель специфичности её нуклеотидного состава

Э. Чаргафф продолжал заниматься изучением состава ДНК, и через 16 лет после открытия первого закона он разделил молекулу на две отдельные нити и обнаружил, что количество оснований не равно точно, а лишь приблизительно. Это и есть второе правило Чаргаффа: в отдельной нити дезоксирибонуклеино-

вой кислоты количество аденина приблизительно равно количеству тимина, а гуанина – цитозину.

Нарушения равенства оказались прямо пропорциональны длине анализируемого участка. Точность сохраняется на длине в 70–100 тысяч пар нуклеотидов, но на длинах в сотни пар и меньше оснований оно уже не сохраняется. Почему у одних организмов процент гуанина-цитозина выше процента аденина-тимина или наоборот, наука пока не объяснила. Ведь в обычных геномах организмов равное распределение нуклеотидов, скорее, исключение, чем правило.

С развитием техник секвенирования геномов обнаружилось, что в одиночной цепочке ДНК содержится приблизительно одинаковое количество комплементарных одиночных нуклеотидов, пар нуклеотидов (динуклеотидов), три-нуклеотидов и так далее – до олигонуклеотидов (участков в 10–20 нуклеотидов). Этому правилу подчиняются геномы всех известных живых организмов, за совсем не большим исключением.

Так, двое бразильских ученых – биолог Майкл Ямагиши и математик Роберто Херай – использовали теорию множеств, чтоб проанализировать необходимые для последовательности нуклеотиды, чтобы они приводили к выполнению правила Чаргаффа. Они вывели четыре уравнения множеств и протестировали 32 генома известных видов. И оказалось, что фрактально-подобные закономерности верны для большинства видов, включая кишечную палочку, растений и человека. А вот вирус иммунодефицита человека и паразитическая бактерия, вызывающая быстрое увядание оливковых деревьев, совершенно не подчиняются закономерностям правила Чаргаффа. Почему? Ответ пока не найден.

**Типовой эксперимент** в генной инженерии состоит из следующих этапов:

1. Получение фрагмента (или смеси фрагментов) ДНК.
2. Конструирование *in vitro* рекомбинантных молекул ДНК, состоящих из фрагментов, полученных на первом этапе, и небольших автономных, реплицирующихся в клетке – реципиента структур (плазмид, фагов, вирусов), носящих название вектор.
3. Введение рекомбинантных ДНК в клетку – реципиент.
4. Отбор клонов, несущих нужную рекомбинационную молекулу.

#### ***Схема типичного опыта***

Плаزمид – вектор и чужеродная ДНК расщепляется эндонуклеазой рестрикции, образуя фрагменты линейной двунитевой ДНК с комплементарными «липкими концами». В процессе «отжига» (процесс реассоциации молекул ДНК с образованием водородных связей между комплементарными основаниями) могут образоваться различные комбинации фрагментов, в том числе и кольцевая структура, содержащая вектор и искомый фрагмент чужеродного

ДНК. Обработка лигазой делает кольцо ковалентно замкнутыми. После трансформации и высева на селективную среду отбирают колонии, несущие гибридную плазмиду.

### Первый этап. Получение фрагмента (или смеси фрагментов) ДНК

#### Источники ДНК для клонирования

1. Фрагменты генетического материала различных организмов.
2. Ферментативный синтез генов на основе выделенной из клетки матричной РНК (мРНК).

Пробные копии применяются для экспрессии в бактериях важных с медицинской точки зрения белков человека и животных (инсулин, ренин, гормон роста и др.). Фрагменты генома нельзя использовать, так как у эукариот отдельные части некоторых структурных генов разобщены: кодирующие последовательности (экзоны) чередуются с не кодирующими вставочными последовательностями (интроны).

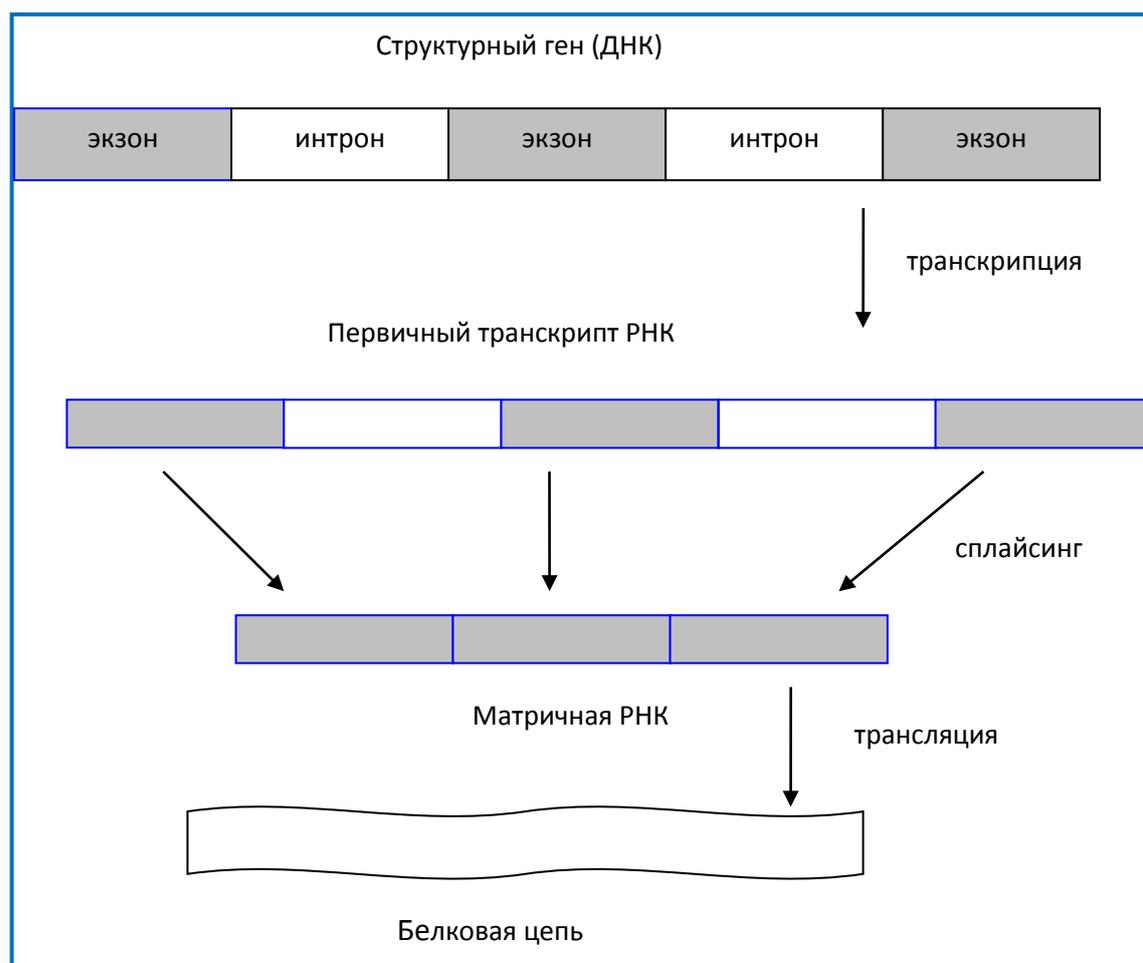
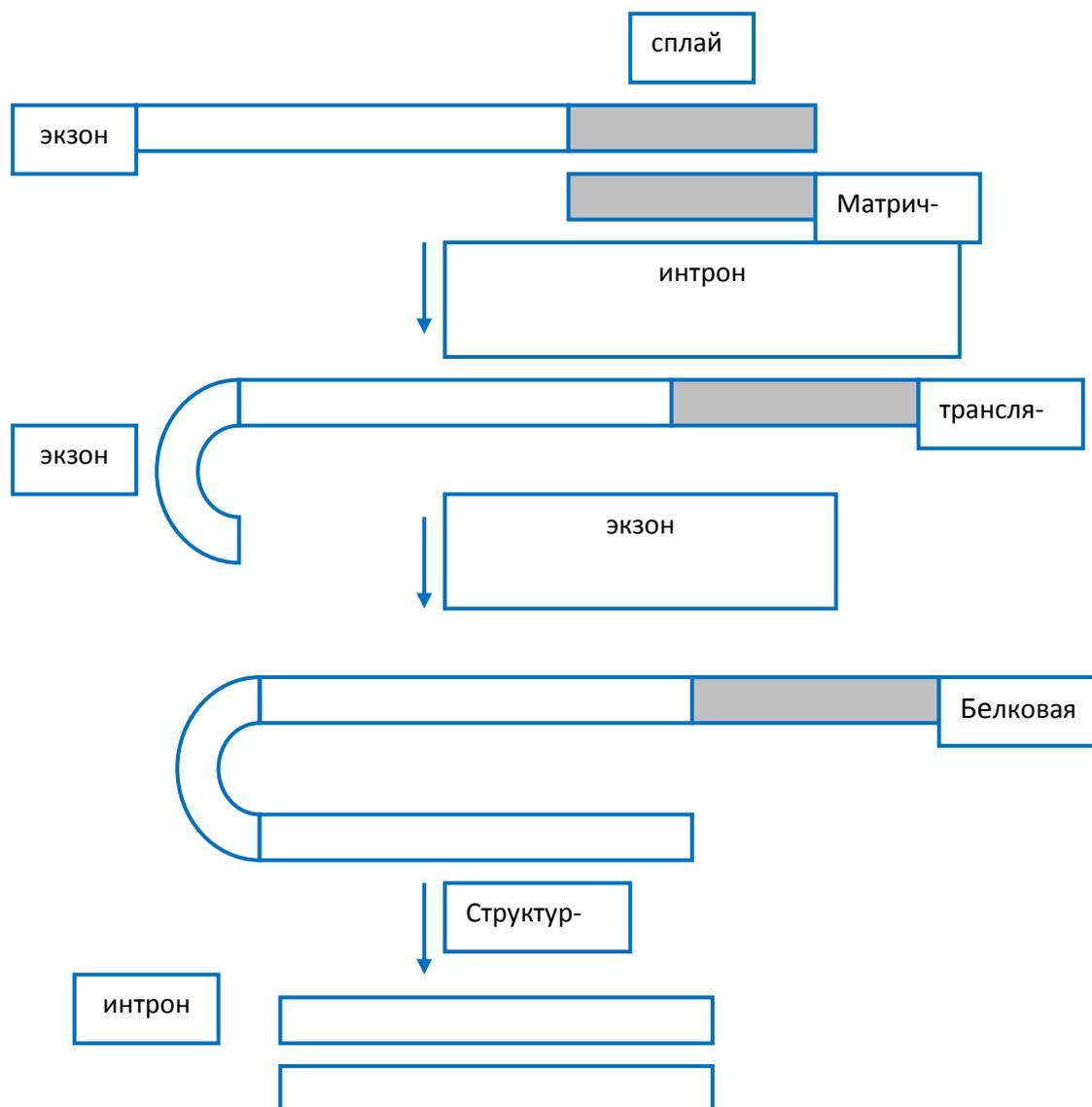


Схема экспрессии у эукариот

Ген целиком транскрибируется с образованием первичного транскрипта РНК, затем транскрипты интронов выщепляются, а последовательности, соот-

ветствующие экзонам, сшиваются с образованием мРНК. Этот процесс созревания РНК называется сплайсингом. Прокариоты не способны к нему.

Это наиболее популярный метод синтеза генов. Обратная транскриптаза (ревертаза) катализирует синтез нити ДНК, комплементарной мРНК. Полученную одноцепочечную ДНК, называемую комплементарной ДНК или кДНК, используют в качестве матрицы для синтеза второй нити ДНК с применением ДНК-полимеразы или ревертазы. Преимущество рассматриваемого метода состоит в том, что ген получается без интронов и других нетранскрибируемых последовательностей. Помимо этого, легче создать условия, когда клетка аккумулирует нужный вид мРНК, чем отбирать ген из смеси фрагментов ДНК. Большим успехом в применении метода является получение в 1979 г. гена гормона роста человека (соматотропина).



Синтез двунитевой копии ДНК по матрице зрелой информационной РНК

Реакцию обратной транскрипции проводят в специально подобранных условиях с использованием сильных ингибиторов РНКазной активности. При этом удается получать полноразмерные ДНК-копии целевых молекул РНК. В качестве праймера при обратной транскрипции поли (А)-содержащих мРНК используют олиго-dT, а для молекул РНК, не имеющих 3'-поли (А) концов, используют химически синтезированные олигонуклеотиды, комплементарные 3'-концу изучаемой РНК. После синтеза на мРНК комплементарной цепи ДНК и разрушения РНК (обычно применяют обработку щелочью) осуществляют синтез второй цепи ДНК. При этом используют способность ревертазы образовывать на 3'-концах одноцепочечных кДНК самокомплементарные шпильки, которые могут выполнять функции праймера.

Матрицей служит первая цепь кДНК. Данная реакция может катализироваться как ревертазой, так и ДНК-полимеразой I *E. coli*. Показано, что сочетание этих двух ферментов позволяет повысить выход полноценных двухцепочечных молекул кДНК. По окончании синтеза первая и вторая цепи кДНК остаются ковалентно связанными петлей шпильки, служившей праймером при синтезе второй цепи. Эту петлю расщепляют эндонуклеазой S1, специфически разрушающей одноцепочечные участки нуклеиновых кислот. Образующиеся при этом концы не всегда оказываются тупыми, и для повышения эффективности последующего клонирования их репарируют до тупых с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*. Полученную двухцепочечную кДНК можно затем встраивать в клонирующие векторы, размножать в составе гибридных молекул ДНК и использовать для дальнейших исследований.

**Дополнение.** Репликацию ДНК осуществляет фермент ДНК-полимераза. Этот фермент способен наращивать ДНК только на 3'-конце. Вы помните, что молекула ДНК антипараллельна, разные ее концы называются 3'-конец и 5'-конец. При синтезе новых копий на каждой нити одна новая нить удлиняется в направлении от 5' к 3', а другая – в направлении от 3' к 5'-концу. Однако 5' конец ДНК-полимераза наращивать не может. Поэтому синтез одной нити ДНК, той, которая растет в «удобном» для фермента направлении, идет непрерывно (она называется лидирующая или ведущая нить), а синтез другой нити осуществляется короткими фрагментами (они называются фрагментами Оказаки – в честь ученого, который их описал). Потом эти фрагменты сшиваются, и такая нить называется запаздывающей, в целом репликация этой нити идет медленней. Структура, которая образуется во время репликации, называется репликативной вилкой.

Если мы посмотрим в реплицирующуюся ДНК бактерии, а это можно наблюдать в электронном микроскопе, мы увидим, что у нее вначале образуется «глазок», затем он расширяется, в конце концов вся кольцевая молекула ДНК оказывается реплицированной.

Процесс репликации происходит с большой точностью, но не абсолютной. Бактериальная ДНК-полимераза делает ошибки, то есть вставляет не тот нуклеотид, который был в матричной молекуле ДНК, примерно с частотой  $10^{-6}$ . У эукариот ферменты работают точнее, так как они более сложно устроены, уровень ошибок при репликации ДНК у человека оценивается как  $10^{-7}$ - $10^{-8}$ . Точность репликации может быть разной на разных участках генома, есть участки с повышенной частотой мутаций и есть участки более консервативные, где

мутации происходят редко. И в этом следует различать

два разных процесса: процесс появления мутации ДНК и процесс фиксации мутации. Ведь если мутации ведут к летальному исходу, они не проявятся в следующих поколениях, а если ошибка не смертельна, она закрепится в следующих поколениях, и мы сможем ее проявление наблюдать и изучить. Еще одной особенностью репликации ДНК является то, что ДНК-полимераза не может начать процесс синтеза сама, ей нужна «затравка». Обычно в качестве такой затравки используется фрагмент РНК. Если речь идет



о геноме бактерии, то там есть специальная точка, называемая origin (исток, начало) репликации. В этой точке находится последовательность, которая распознается ферментом, синтезирующим РНК. Он относится к классу РНК-полимераз и в данном случае называется праймазой. РНК-полимеразы не нуждаются в затравках, и этот фермент синтезирует короткий фрагмент РНК – ту самую «затравку», с которой начинается синтез ДНК.

### Транскрипция

Следующий процесс – транскрипция. На нем остановимся подробнее.

Транскрипция – синтез РНК на ДНК, то есть синтез комплементарной нити РНК на молекуле ДНК осуществляется ферментом РНК-полимеразой. У бактерий, например, кишечной палочки – одна РНК-полимераза, и все бактериальные ферменты очень похожи друг на друга; у высших организмов (эукариотов) – несколько ферментов, они называются РНК-полимераза I, РНК-полимераза II, РНК-полимераза III; они также имеют сходство с бактериальными ферментами, но устроены сложнее, в их состав входит больше белков. Каждый вид эукариотической РНК-полимеразы обладает своими специальными функциями, то есть транскрибирует определенный набор генов. Нить ДНК, которая служит матрицей для синтеза РНК при транскрипции называется смысловой или матричной. Вторая нить ДНК называется некодирующей (комплементарная ей РНК не кодирует белки, она «бессмысленная»).

В процессе транскрипции можно выделить три этапа.

➤ Первый этап – **инициация** транскрипции – начало синтеза нити РНК, образуется первая связь между нуклеотидами.

➤ Затем идет наращивание нити, ее удлинение – **элонгация**.

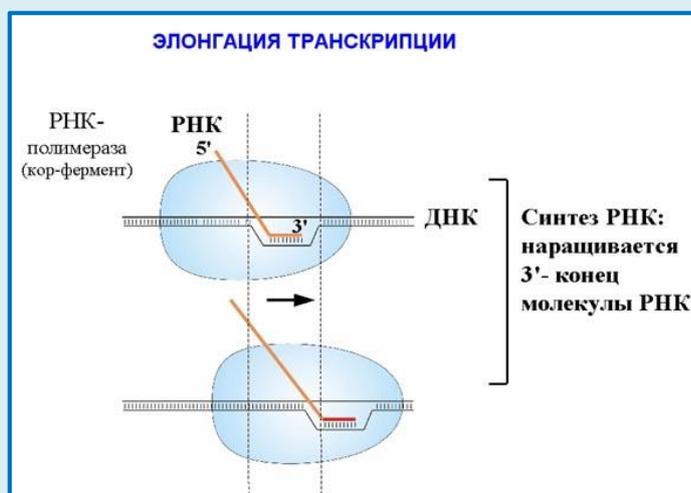
➤ Когда синтез завершен, происходит **терминация** – освобождение синтезированной РНК. РНК-полимераза при этом «слезает» с ДНК и готова к новому циклу транскрипции.

Бактериальная РНК-полимераза изучена очень подробно. Она состоит из нескольких белковых-субъединиц: двух  $\alpha$ -субъединиц (это маленькие субъединицы),  $\beta$ - и  $\beta'$ -субъединиц (большие субъединицы) и  $\omega$ -субъединицы. Вместе они образуют так называемый минимальный фермент, или кор-фермент. К этому кор-ферменту может присоединяться  $\sigma$ -субъединица.  $\sigma$ -субъединица необходима для начала синтеза РНК, для инициации транскрипции. После того, как инициация осуществилась,  $\sigma$ -субъединица отсоединяется от комплекса, и дальнейшую работу (элонгацию цепи) ведет кор-фермент. При присоединении к ДНК  $\sigma$ -субъединица распознает участок, на котором должна начинаться транскрипция. Он называется **промотор**. Промотор – это последовательность нуклеотидов, указывающих на начало синтеза РНК. Без  $\sigma$ -субъединицы кор-фермент промотор распознать не может.  $\sigma$ -субъединица вместе с кор-ферментом называется полным ферментом, или холоферментом.

Связавшись с ДНК, а именно с промотором, который распознала  $\sigma$ -субъединица, хoloфермент расплетает двунитевую спираль и начинает синтез РНК. Участок расплетенной ДНК – это точка инициации транскрипции, первый нуклеотид, к которому должен комплементарно быть присоединен рибонуклеотид. Иницируется транскрипция,  $\sigma$ -субъединица уходит, а кор-фермент продолжает элонгацию цепи РНК. Затем происходит терминация, кор-фермент освобождается и становится готов к новому циклу синтеза.

РНК наращивается на 3'-конце. Присоединением каждого нуклеотида кор-фермент делает шаг по ДНК и сдвигается на один нуклеотид. Так как все в мире относительно, то можно сказать, что кор-фермент неподвижен, а сквозь него «протаскивается» ДНК. Понятно, что результат будет таким же. Но мы будем говорить о движении по молекуле ДНК. Размер белкового комплекса, составляющего кор-фермент, 150 Å. Размеры РНК-полимеразы – 150×115×110 Å. То есть это такая наномашина. Скорость работы РНК-полимеразы – до 50 нуклеотидов в секунду. Комплекс кор-фермента с ДНК и РНК называется *элонгационным комплексом*. В нем находится ДНК-РНК гибрид. То есть это участок, на котором ДНК спарена с РНК, и 3'-конец РНК открыт для дальнейшего роста. Размер этого гибрида – 9 пар оснований. Расплетенный участок ДНК занимает примерно 12 пар оснований. РНК-полимераза связана с ДНК перед расплетенным участком. Этот участок называется *передним дуплексом ДНК*, его размер – 10 пар оснований. Полимераза связана также с более длинной частью ДНК, называемой *задним дуплексом ДНК*. Размер матричных РНК, которые синтезируют РНК-полимеразы у бактерий, могут достигать 1000 нуклеотидов и больше. В эукариотических клетках размер синтезируемых РНК может достигать 100000 и даже нескольких миллионов нуклеотидов. Правда, неизвестно, существуют ли они в таких размерах в клетках, или в процессе синтеза они могут успеть процессировать.

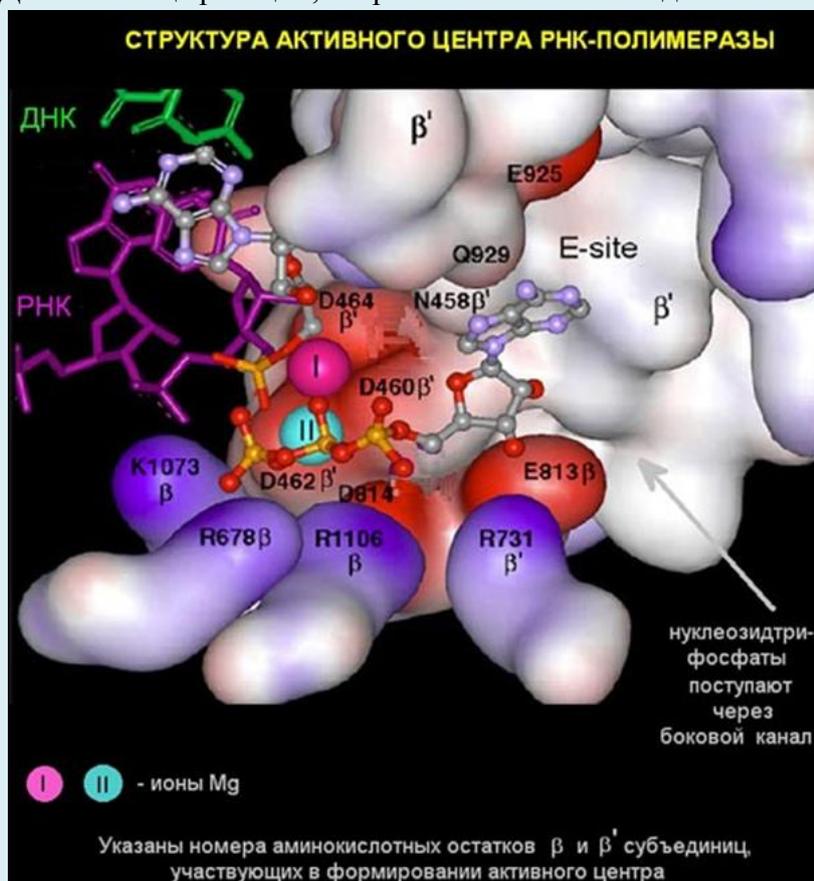
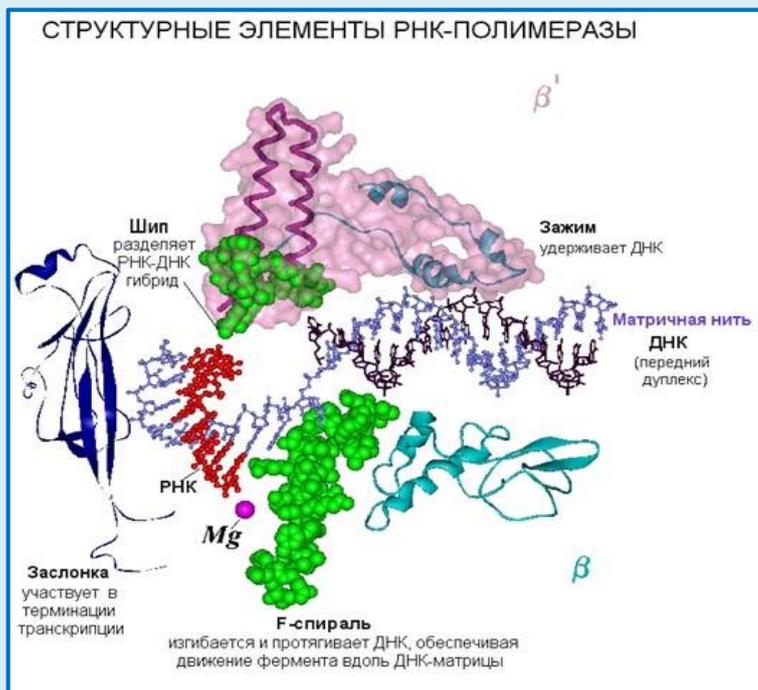
РНК-полимераза работает как молекулярная машина, и в ней есть различные детали, каждая из которых выполняет свою функцию. Например, нависающая над «пастью» часть  $\beta'$ -субъединицы удерживает передний ДНК-дуплекс. Эта часть называется «заслонкой». После связывания с ДНК заслонка опускается, проходя путь в 30 ангстрем, и зажимает ДНК так, чтобы она не могла выпасть в процессе транскрипции. Внутри «пасти» находится активный центр РНК-полимеразы, то есть то место, где непосредственно происходит комплементарное взаимодействие поступившего по боковому каналу рибонуклеозидтрифосфата с ДНК-матрицей. Если вновь прибывший нуклеотид комплементарен матрице, то он ферментативно пришивается к свободному 3'-концу РНК. По характеру реакция образования новой связи в РНК относится к реакциям нуклеофильного замещения. В ней участвуют два иона магния.



Один ион постоянно находится в активном центре, а второй ион магния поступает с нуклеотидом и после образования новой связи между рибонуклеотидами уходит, затем поступает новый нуклеотид со своим новым ионом магния. При выходе из РНК-полимеразы ДНК-РНК гибрид должен быть расплетен. В этом участвует структура, называемая «шип».

В транслокации, то есть перемещении РНК-полимеразы по нити ДНК, участвует  $\alpha$ -спиральная структура, снизу вверх торчащая из  $\beta$ -субъединицы. Как же узнали, какая часть фермента какую роль выполняет? Молекулярные биологи поступают следующим образом. Они удаляют часть белковой последовательности и смотрят, какая функция исчезла. Было показано, что если выбросить фрагмент зажима (когда его выбрасывали, еще не знали, что он держит ДНК), то ДНК держаться не будет. Такой же результат получается, если удалить ДНК переднего дуплекса. Оставшаяся часть – РНК-ДНК гибрид и задний дуплекс – оказываются слабо связанными с РНК-полимеразой.

Известно, что магний координирует связь между фосфатами растущей молекулы ДНК и фосфатами вновь входящих нуклеотидов. При этом происходит последовательность реакций, называемых реакциями нуклеофильного замещения. Известно, каким образом меняются связи внутри этого комплекса. Новый нуклеотид приходит, будучи связанным с еще одним ионом магния. Новый нуклеотид таким образом взаимодействует с растущей цепью ДНК. В конце реакции, второй ион магния выводится из активного центра фермента.



РНК-полимераза является представителем молекулярных машин. Помимо того, что в начале синтеза ДНК опускается заслонка, меняется конформация других частей РНК-синтазы, в ней во время роста цепи РНК происходят циклические изменения, не такие сильные, как при начале синтеза цепи. В начале заслонка опускается на 30 Å, а при каждом шаге фермента ДНК протягивается на один нуклеотид. В перемещении по ДНК участвует элемент РНК-полимеразы – F-спираль (альфа-спиральная структуры, торчащая из бета-субъединицы вверх в главный канал). F-спираль при этом изгибается, перемещается вместе с комплексом РНК-ДНК, освобождается от них и опять выпрямляется. Перемещается

F-спираль за один шаг на 3,4 Å. Именно такой шаг у РНК-полимеразы.

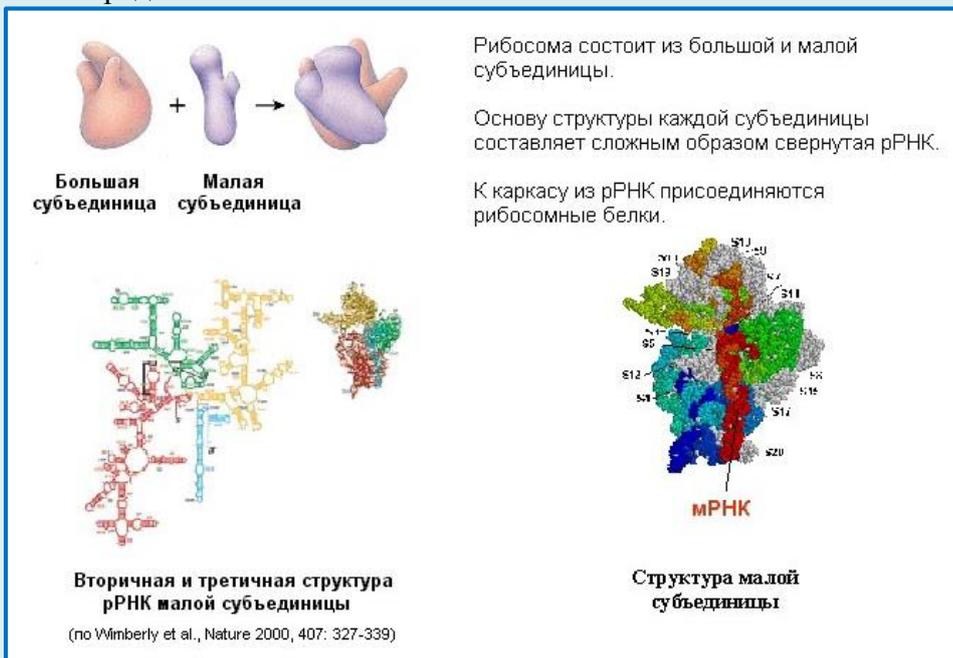
Изменение конформации различных частей РНК-полимеразы происходит за счет изменения потенциальной энергии, что связано с электростатическими и гидрофобными взаимодействиями. Можно провести следующую аналогию. Если взять поднос с горкой яблок, то после того, как мы этот поднос потрясем, яблоки будут рассыпаться ровным слоем по подносу. У них при этом изменится потенциальная энергия, связанная с действием силы тяжести. Если молекулу РНК-синтазы «потрясти» (а «трясет» ее также, как и все другие молекулы в клетке, броуновское движение), то она начнет принимать конформацию с более низкой потенциальной энергией. То есть, источником движения молекулярной машины является энергия теплового движения отдельных ее составляющих, а устройство машины таково, что это движение приводит к нужному результату. При этом молекулярная машина потребляет энергию, которая, в основном, идет на изменение состояния тех или иных связей.

### Трансляция

Перейдем к *трансляции* – синтезу белков. Она проводится *рибосомами*. Рибосома состоит из двух субчастиц: большой и малой.

Каждая субчастица состоит из нескольких десятков белков. Все из них уже изучены. Известно, каким образом каждый белок уложен в субчастицу. При исследовании белков используют метод электрофореза, то есть в электрическом поле в специальном геле или специальном носителе молекулы белков разъединяются в зависимости от их заряда и молекулярного веса, то есть под действием поля они начинают двигаться и могут отодвигаться друг от друга на разное расстояние. Другим методом разделения белков является хроматография, в результате этого метода на носителе получают пятнышки, каждый из которых соответствует отдельному белку.

Белки в рибосоме держатся на каркасе, состоящем из рибосомной РНК. Формирование рибосомы начинается с того, что рибосомная РНК сворачивается, и на нее в определенном порядке начинают налипать белки.

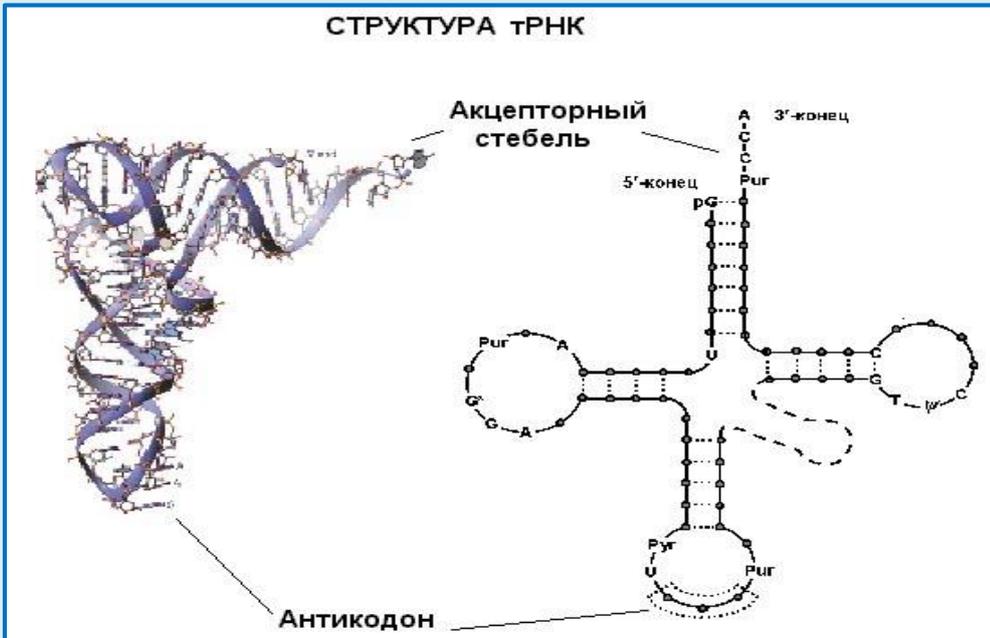


На рисунке представлена рибосомная РНК. В ней самокомплементарные участки нити РНК спариваются, образуя шпильки (вторичная структура), и затем РНК сворачивается (третичная структура РНК), образуя каркас субчастиц.

Еще один вид РНК, участвующей в синтезе белка, это *транспортная РНК (тРНК)*. Молекулы тРНК относительно

небольшие (по сравнению с рибосомной или матричной РНК). Все тРНК имеют общую вторичную структуру. За счет спаривания комплементарных участков молекулы тРНК образуется три «стебля» с петлями на концах и один «стебель», образованный 5'- и 3'-концами молекулы тРНК (иногда образуется еще дополнительная пятая петля). Изображение этой структуры похоже на крест или клеверный лист.

## СТРУКТУРА тРНК



«Голова» на этом листе представлена антикодонной петлей, здесь находится антикодон – те три нуклеотида, которые комплементарно взаимодействуют с кодоном в мРНК. Противоположный антикодонной петле стебель, образованный концами молекулы, называется акцепторным стеблем – сюда

присоединяется соответствующая аминокислота. Распознают подходящие друг другу тРНК и аминокислоты специальные ферменты, называемые аминоацил-тРНК синтетазами. Для каждой аминокислоты есть своя аминоацил-тРНК синтетаза.

В рибосоме находится матричная РНК (мРНК). С кодоном (тремя нуклеотидами) мРНК комплементарно связан антикодон транспортной РНК, на которой висит остаток аминокислоты. На рисунке видна такая структура (тРНК вместе с аминокислотой, которая называется аминоацил-тРНК).

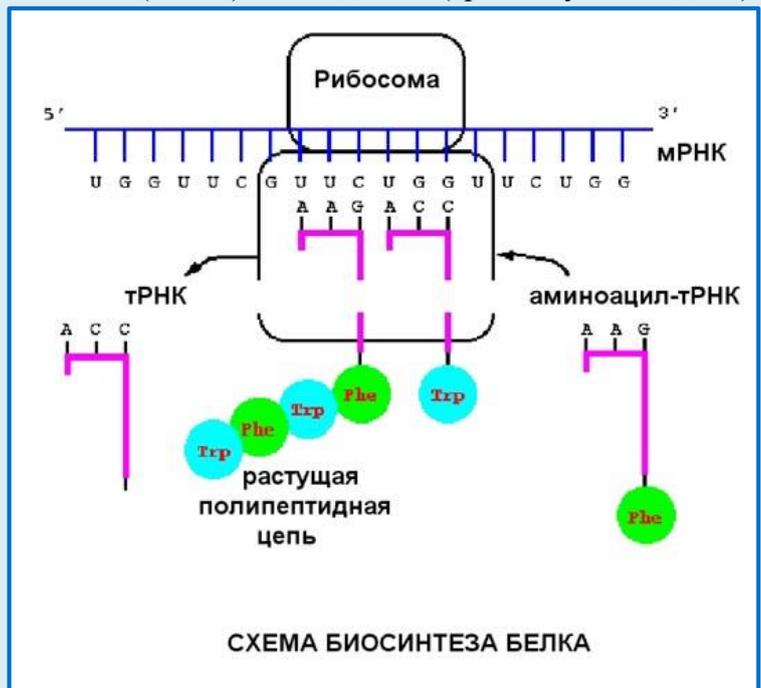
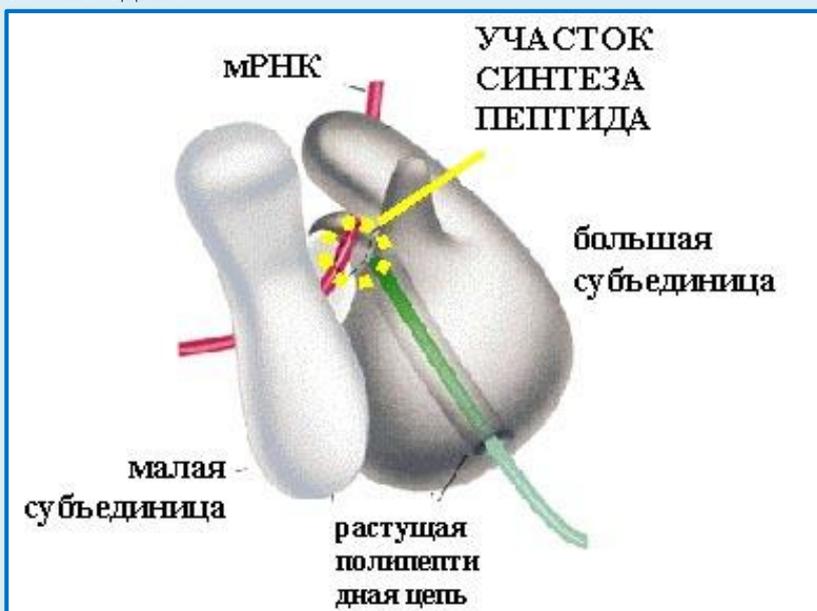


СХЕМА БИОСИНТЕЗА БЕЛКА

Процесс трансляции так же, как и процесс транскрипции, связан с перемещением вдоль молекулы нуклеиновой кислоты, разница в том, что рибосома шагает на три нуклеотида, в то время как РНК-полимераза – на один.

Аминокил т-РНК входит в рибосому, комплементарно связываясь с кодоном мРНК, затем происходит реакция, при которой аминокислотные остатки связываются друг с другом, а т-РНК удаляется.



«Словарь» для перевода с языка нуклеотидов на язык аминокислот называется генетическим кодом. Аминокислот – 20, нуклеотидов – 4, число комбинаций из 4 по 2 = 16, а, поэтому кодировка не двух, а трехбуквенная, каждая тройка называется кодоном.

Каждая аминокислота кодируется тремя нуклеотидами в мРНК (которая, в свою очередь, кодируется ДНК).

		В Т О Р О Й Н У К Л Е О Т И Д													
		У			С			А			Г				
ПЕРВЫЙ НУКЛЕОТИД	U	UUU	Phe	F	UCU			UAU	Tyr		UGU	Cys	C	ТРЕТИЙ НУКЛЕОТИД	U C A G
		UUC	Phe		UCC	Ser	S	UAC	Tyr	O	UGC	Cys			
		UUA	Leu		UCA			UAA	Term		UGA	Term			
		UUG	Leu		UCG			UAG	Term		UGG	Trp	W		
C	CUU	Leu		CCU			CAU	His	H	CGU			U		
	CUC	Leu	L	CCC	Pro	P	CAC	His		CGC	Arg		C		
	CUA	Leu		CCA			CAA	Gln	Q	CGA			A		
	CUG	Leu		CCG			CAG	Gln		CGG			G		
A	AUU	Ile		ACU			AAU	Asn	N	AGU	Ser		U		
	AUC	Ile	I	ACC	Thr	T	AAC	Asn		AGC	Ser		C		
	AUA	Ile		ACA			AAA	Lys	K	AGA	Arg	R	A		
	AUG	Met	M	ACG			AAG	Lys		AGG	Arg		G		
G	GUU	Val		GCU			GAU	Asp	D	GGU			U		
	GUC	Val	V	GCC	Ala	A	GAC	Asp		GGC	Gly	G	C		
	GUA	Val		GCA			GAA	Glu	E	GGA			A		
	GUG	Val		GCG			GAG	Glu		GGG			G		

В таблице боковые столбцы кодируют левую и правую букву кодона, верхняя строка – среднюю. Например, кодон AUG кодирует аминокислоту метионин. Число комбинаций из 4 по 3 = 64, то есть некоторые аминокислоты кодируются несколькими кодонами. Три кодона не кодируют никакую аминокислоту, они называются терминирующими. Когда они попадают в мРНК, рибосома прекращает свою работу, и готовая полипептидная цепь выбрасывается наружу.

Таблица генетического кода была составлена в 60-х гг. Начало положили Ниренберг и Маттеио. Они пытались производить в пробирке эксперименты на клеточных экстрактах, к которым были добавлены искусственные матрицы РНК. В то время считалось, что кодоны,

состоящие из одного нуклеотида (UUU или AAA), не кодируют аминокислоты. Ниренберг и Маттеи использовали полиУ-РНК (то есть состоящую только из урацилов) в качестве контроля в своих опытах, но именно в этой пробирке прошла реакция. Стало ясно, что кодон UUU кодирует аминокислоту фенилаланин. Затем была составлена таблица генетического кода.

Генетический код универсален. Он один и тот же у всех микроорганизмов. Есть небольшие отличия в генетическом коде митохондрий.

Генетическим кодом называется таблица соответствия кодонов аминокислотам. Когда журналисты пишут о том, что недавно расшифрован генетический код человека – это грубая терминологическая ошибка. Генетический код человека расшифрован тогда же, когда и всех остальных живых существ – в 60-х гг. XX в. Недавно расшифрован геном человека, то есть полная последовательность нуклеотидов всех молекул ДНК.

### *3. Химико-ферментативный синтез генов*

Прежде всего нужна предварительная информация о нуклеотидных последовательностях гена или аминокислых последовательностях в соответствующем белке. Т.е. нужно клонировать фрагмент ДНК, особенно в случае геномов большой сложности, каковыми являются даже геномы бактерий.

#### **Второй этап. Введение гена в вектор**

Ген, полученный тем или иным способом, содержит информацию о структуре белка, но сам по себе не может реализовать эту информацию. Нужны дополнительные механизмы, управляющие действием гена, поэтому перенос генетической информации в клетку осуществляется в составе векторов. **Векторы** – это, как правило, кольцевые молекулы, способные к самостоятельной репликации. Ген вместе с вектором образует рекомбинантную ДНК.

#### ***Требования к векторной ДНК, ее состав***

Вектор – молекула ДНК или РНК, состоящая из двух компонентов: векторной части (носителя) и клонируемого чужеродного гена. Задача вектора – донести выбранную ДНК в клетку-реципиент, встроить ее в геном, позволить идентификацию трансформированных клеток, обеспечить стабильную экспрессию введенного гена. Таким образом, вектор должен быть небольшим, способным поддерживаться в клетке-хозяине (реплицироваться), многократно копироваться (амплифицироваться), экспрессировать соответствующий ген (содержать соответствующие регуляторные последовательности), должен иметь *маркерный ген*, позволяющий различать гибридные клетки для эффективной селекции их; должен быть способен передаваться в клетку соответствующего организма. Можно выделить 2 группы маркерных генов, позволяющие отличить трансформированные клетки:

1. *Селективные гены*, отвечающие за устойчивость к антибиотикам (канамицину, тетрациклину, неомицину и др.), гербицидам (у растений). Это могут быть гены ауксотрофности по какому-либо субстрату и т.д. Основной принцип работы такого маркера – способность трансформированных клеток

расти на селективной питательной среде, с добавкой определенных веществ, ингибирующих рост и деление нетрансформированных, нормальных клеток.

2. *Репортерные гены*, кодирующие нейтральные для клеток белки, наличие которых в тканях может быть легко тестировано.

### **Типы векторов для введения гена в клетку**

#### **Бактериальные плазмиды**

Поскольку плазмидная ДНК значительно меньше хромосомной, ее довольно легко выделить в чистом виде. В присутствии ионов кальция плазмиды легко поглощаются бактериями-реципиентами, даже если те их никогда не содержали, и в клетках бактериального потомства можно обнаружить много копий поглощенной плазмиды. Однако бактериальная клетка обычно может содержать в своем составе плазмиды одного типа. Это явление несовместимости плазмид. Существуют группы несовместимости – Inc-группы (от английского *incompatibility* – несовместимость). В такой группе может быть несколько плазмид, совместимых между собой, но не совместимых с другими плазмидами. У этих плазмид сходны многие признаки и часто значительна гомология ДНК.

Число копий плазмиды в клетке может существенно варьировать. Это зависит от генетических особенностей как клетки, так и плазмиды. Плазмиды, находящиеся «под ослабленным контролем», могут размножаться до тех пор, пока их количество не достигнет 10–200 копий на клетку. Если же плазида находится «под строгим контролем», она реплицируется с той же скоростью, что и главная хромосома. Такие плазмиды содержатся в клетке в одной или в нескольких копиях. Естественно, что для клонирования рекомбинантных ДНК стараются использовать плазмиды первого типа. Но это не обязательно, так как плазмиды в присутствии хлорамфеникола могут умножаться независимо от деления хромосомы, и количество копий плазмиды может многократно увеличиваться.

Одна их наиболее часто употребляемых плазмид для клонирования pBR 322 создана на основе плазмид природного происхождения, выделенных из *E. coli*. Эта плазида содержит гены устойчивости к двум антибиотикам: ампициллину и тетрациклину, причем в генах устойчивости к этим антибиотикам имеются сайты рестрикции. Если фрагмент чужеродной ДНК встраивается в один из генов устойчивости, то последний инактивируется. Следовательно, успешное встраивание фрагмента чужеродной ДНК в один из этих генов легко детектировать по исчезновению у бактерий устойчивости к данному антибиотику. Но при этом сохраняется устойчивость к другому антибиотику. Таким образом, вектор дает возможность детектировать только те клоны бактерий, которые содержат рекомбинантную плазмиду.

## Вирусы

Есть вирусы, которые не ведут к гибели клетки, но встраиваются в геном клетки-хозяина и размножаются вместе с ней, либо вызывают ее неконтролируемый рост, т.е. превращают в раковую. К таким относятся ДНК-вирусы SV-40 и вирус полиомы. Внедрение некоторых опухолевых РНК-вирусов ведет к отпочковыванию вирусных частиц от клетки без ее лизиса. К таким вирусам относятся, например, ретровирусы (вирус саркомы Рауса и СПИДа). Для бактериальных клеток в качестве вектора часто используют бактериофаги.

Вирусы являются одними из главных кандидатов на роль векторов для введения чужеродной ДНК. При вирусной инфекции каждая клетка может получить большое число копий чужеродного гена. ДНК можно встраивать так, чтобы она находилась под контролем сильных вирусных промоторов, что обеспечит высокий уровень экспрессии гена, и его продукты будут более доступны для исследования.

В последние годы сконструированы многочисленные «челночные» векторы и их рекомбинантные производные, способные к репликации в животной и бактериальной клетке и эффективно экспрессирующие клонируемый ген в животной клетке. Наиболее распространенные векторы состоят из плазмиды pBR322 и интактного раннего района транскрипции ДНК SV40, а нужный ген встраивается под контроль промотора поздних генов или дополнительного раннего промотора. Например, в ДНК SV40 был встроены ген  $\beta$ -глобина кролика, который экспрессировался в линии клеток обезьяны, зараженных рекомбинантным вирусом: в клетках синтезировались и мРНК гена глобина, и сам белок.

Вирус должен быть жизнеспособным после рекомбинирования его ДНК. Легче всего вирусы вводятся в бактерии. Недостатком вирусов как векторов является их небольшая емкость. Кроме того, вирусы заражают небольшой круг хозяев.

Лучшие векторы разработаны на основе фага М13. В зрелую фаговую частицу входит одноцепочечная ДНК длиной 6500 нуклеотидов. После проникновения в клетку одноцепочечной ДНК фага превращается в двуцепочечную репликативную форму (РФ), которую выделяют из клеток и используют как вектор для клонирования. В информационной клетке накапливается 100–200 копии РФ ДНК. После этого синтез становится ассиметричным и синтезируется лишь одна нить ДНК, которая входит в состав зрелого фага. Фаг М13 не убивает клетку, но лишь замедляет ее деление. Частицы зрелого фага непрерывно выделяются в среду и их титр в культуральной жидкости может достигать  $10^{12}$  в 1 мл.

Основное преимущество – выделяемые клеткой частицы бактериофага содержат одноцепочечную ДНК, гомологичную одной из двух комплиментар-

ных цепей, клонируемой ДНК. Такая ДНК непосредственно может быть использована для определения последовательности оснований ДНК.

Существуют гибридные вектора, содержащие ДНК фага и плазмиды. К ним относятся, например, **космиды и фазмиды**.

*Космиды* – плазмиды, несущие *cos* – участок (липкие концы) ДНК фага  $\lambda$ . Наличие в составе космид участка *cos* позволяет производить упаковку ДНК в головку фага *in vitro*. Таким образом, космиды могут быть введены в клетку не с помощью трансформации, а путем обычной инфекции. Эффективность последнего превышает эффективность трансформации по меньшей мере в 100 раз. Космиды – векторы с наибольшей емкостью, и потому они специально предназначены для клонирования больших фрагментов эукариотической ДНК и создания клонотек генов.

*Фазмиды* также являются гибридами между фагом и плазмидой. После встройки чужеродной ДНК могут в одних условиях развиваться как фаги, в других – как плазмиды. Такая двойственная форма существования, вернее сосуществования с клеткой – хозяином, не является чисто искусственным изображением. Известны природные бактериофаги, которые в виде профага не интегрируют в хромосому, а существуют в плазмидной форме. По клонирующей емкости фазмиды значительно уступают космидам. Сам вектор способен существовать в виде плазмиды, а клонотека получается и хранится в виде суспензии гибридных фагов.

### **Вироиды**

Из всех известных в настоящее время инфекционных агентов имеют ранг наиболее странных. Известно, что самые мелкие вирусы, способные к независимой репликации, имеют размеры генома, соответствующие молекулярной массе 1 М, то есть около 1500 тыс. пар оснований. Это считали минимальным количеством генетической информации, необходимой для кодирования вирусоспецифических продуктов и подавления метаболизма хозяйской клетки.

Однако в 1971 г. были открыты инфекционные агенты, которые представляют собой очень короткую цепь 1-нитевой ковалентно связанной кольцевой РНК, состоящую из 270–300 нуклеотидов (на три порядка меньше самых минимальных вирусов), не заключенную в белковую оболочку. Это необычные патогены – самые простые и самые маленькие из всех известных.

Каким образом виroidы продуцируют симптомы болезни в инфицированных растениях, не известно до сих пор. Установлено, что они реплицируются ферментами клетки-хозяина, не транслируются в видоспецифичные полипептиды, интегрируются в геном клетки-хозяина.

Вироиды заражают персистентно (не происходит выздоровления). Вызывают системную инфекцию, т.е. мигрируют из сайта внедрения в другие части

растений, переносятся механически или через клеточный сок, через семена, пыльцу. Вироиды также связаны с ядерными фракциями растений и могут размножаться в ядрах.

При работе с виридами получают однонитевую ДНК-копию РНК и встраивают комплементарную нить для получения двунитевой ДНК вирида. Такая двуцепочечная ДНК встраивается в плазмиду и передается в клетки *E. coli* для клонирования. Считывание гена начинается с промотора, который узнается РНК-полимеразой, отвечающей за транскрипцию ДНК в матрицу РНК. Обычно это фрагмент ДНК из 41–44 пар оснований. Ген считывается слева направо, от 5' к 3' концу гена и заканчивается в терминальной области гена. За промотором начинается стартовый сайт транскрипции, за которым следует смысловая часть гена. Промоторная область гена содержит определенные короткие сочетания нуклеотидов, характерные для бактериальных генов, или для генов высших организмов. Такие сочетания служат сигналами для РНК-полимеразы, которая присоединяется к промоторной части гена и начинает его считывать.

Однонитевые и двунитевые ДНК способны инициировать репликацию вирида в механически инокулированных растениях табака. Энзиматически *in vitro* синтезированы также РНК виридов, высокоинфекционные для растений. Векторные системы могут быть разработаны на основе самих РНК, на основе виридоспецифичных ДНК, а также в комбинации виридоспецифичных ДНК с *Ti*-плазмидами. Вироиды инфицируют своих хозяев в течение всего их жизненного цикла, поэтому в случае использования виридных векторных систем можно ожидать постоянной экспрессии чужеродного гена в растении.

### **Транспозоны**

Транспозоны – сегменты ДНК, которые контролируют собственную транспозицию (перемещение) из одного сайта ДНК в другой путем вырезания из исходного сайта и внедрения в новый сайт хромосомы или плазмиды. Впервые были открыты в 40-х гг. у кукурузы американским ученым Барбарой Мак-Клинток. Эти гены, идентифицированные по их способности подавлять экспрессию других генов кукурузы, находящихся рядом с ними, не имели фиксированного положения в хромосоме. Они как бы передвигались по всему геному растения. Регуляторные элементы могли встраиваться и выщепляться, причем после их выщепления зачастую начинали функционировать ранее молчащие гены.

Оказалось, что гены, ассоциированные с регуляторными элементами, становились нестабильными и часто мутировали из-за нестабильности самих этих элементов. В течение многих лет кукуруза оставалась единственной си-

стемой, в которой обнаруживались такие подвижные генетические элементы. Сейчас они обнаружены у бактерий, дрожжей и других организмов.

Механизм перемещения фрагментов ДНК по геному до конца не выяснен. ДНК переносится ферментом транспозазой. Фермент кодируется последовательность длиной около 20 нуклеотидов в середине транспозона. Он специфически взаимодействует с концевыми инвертированными повторами мобильного элемента и может вырезать его из хромосомы. Вырезание может происходить точно (с восстановлением исходной структуры участка ДНК) и неточно (с делециями и вставками от одного до нескольких нуклеотидов). Это приводит к появлению стабильных мутаций и является одним из механизмов создания новых последовательностей ДНК.

Как правило, мобильные генетические элементы многократно повторены в геноме и образуют гетерогенные семейства, члены которых диспергированы по хромосомам. Большая часть членов каждого семейства являются дефектными копиями и не кодируют какой-либо функции, хотя сохраняют способность к перемещению. Поведение транспозонов можно расценить как паразитическое. Длина их от 2 до 10 тысяч нуклеотидных пар. У высших эукариот на долю транспозонов приходится примерно 10 % ДНК клетки. Большинство их перемещается изредка, но так как их в клетке довольно много, транспозиция оказывает значительное влияние на разнообразие видов.

Биологический смысл перемещения отдельных сегментов ДНК:

- прерывание соответствующего гена, что ведет к эволюции;
- регуляция деятельности генов, так как транспозоны могут нести сигналы для начала считывания генов. В новых областях усиливают или запрещают работу гена.

### **Ферменты генетической инженерии**

#### ***Рестриктазы***

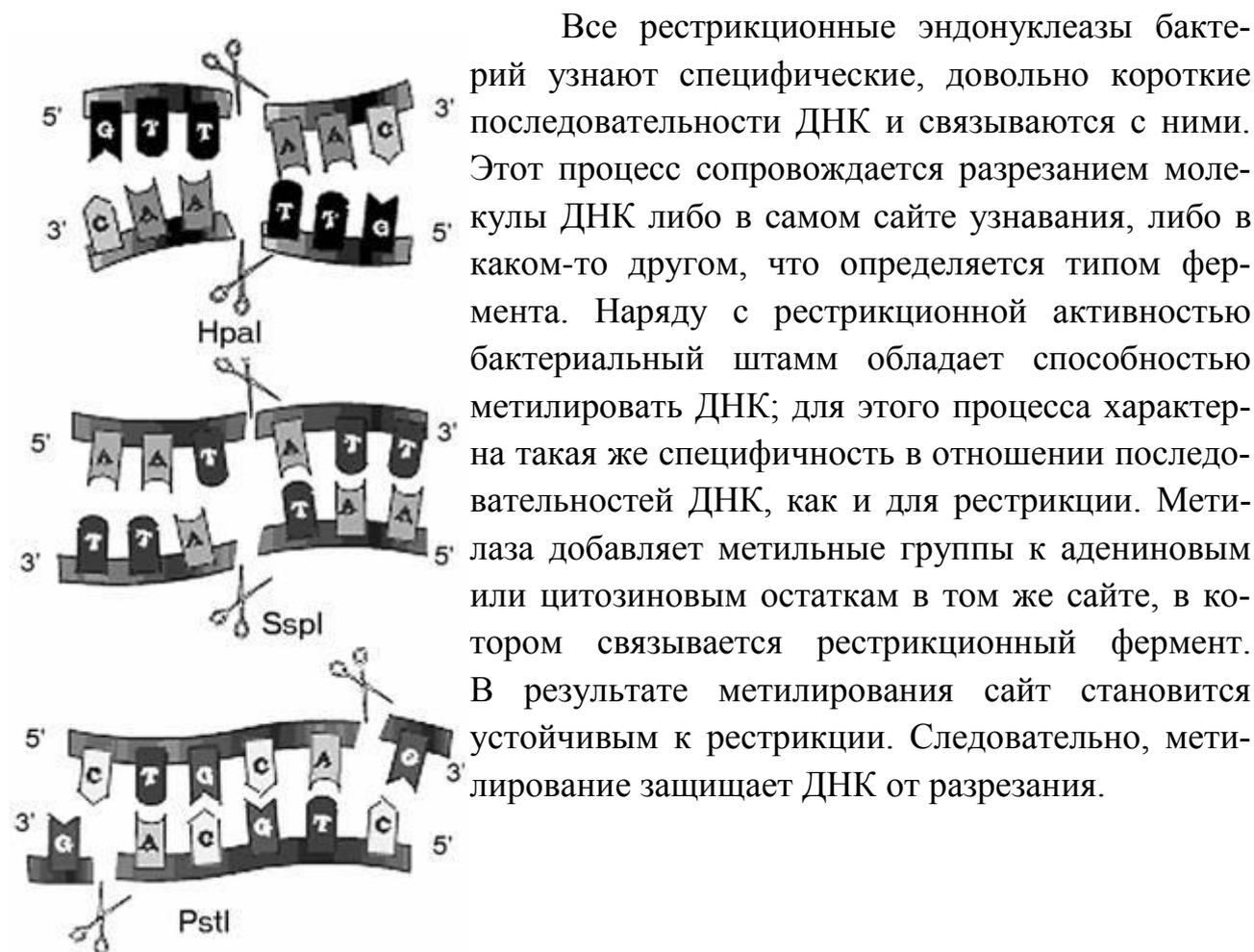
Рестриктазы (рестрицирующие эндонуклеазы, эндонуклеазы рестрикции) – это ферменты, узнающие и атакующие определенные последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК (сайты рестрикции).

Еще в 1953 г. было обнаружено, что ДНК определенного штамма *E. Coli.*, введенная в клетки другого штамма (например, ДНК штамма В – в клетки штамма С), не проявляет, как правило, генетической активности, так как быстро расщепляется на мелкие фрагменты. В 1966 г. было показано, что это явление связано со специфической модификацией хозяйской ДНК – она содержит несколько метилированных оснований, отсутствующих в немодифицированной ДНК, причем метилирование (добавление к основанию метильной группы) происходит уже после завершения репликации. Бактерия способна отличить свою собственную ДНК от любой вторгающейся «чужеродной» именно по типу

ее модификации. За «метку» отвечают метилирующие ферменты модификации, так называемые ДНК-метилазы. Различие в модификации делает чужеродную ДНК чувствительной к действию рестрицирующих ферментов, которые узнают отсутствие метильных групп в соответствующих сайтах.

Системы рестрикции и модификации широко распространены у бактерий; их существование играет важную роль в защите резидентной ДНК от загрязнения последовательностями чужеродного происхождения. Рестриктаза, которая расщепляла неметилованную ДНК, была выделена в 1968 г. Мезельсоном и Юанем. Этот фермент был высокоспецифичен по отношению к определенной последовательности ДНК, но расщеплял молекулы неспецифически, в другом месте, на некотором удалении от участка узнавания. Вскоре, в 1970 г. Смит и Вилькоккс выделили из *Haemophilus influenzae* первую рестриктазу, которая расщепляла строго определенную последовательность ДНК (Hind III). Поскольку разные бактерии по-разному метят свою ДНК, то и рестриктазы должны узнавать разные последовательности. И действительно, с тех пор выделены рестриктазы, узнающие более 150 сайтов рестрикции (мест расщепления ДНК).

Общепринято термины «рестриктаза», «эндонуклеаза рестрикции» и «сайт специфическая эндодезоксирибонуклеаза» считать синонимами.



Все рестрикционные эндонуклеазы бактерий узнают специфические, довольно короткие последовательности ДНК и связываются с ними. Этот процесс сопровождается разрезанием молекулы ДНК либо в самом сайте узнавания, либо в каком-то другом, что определяется типом фермента. Наряду с рестрикционной активностью бактериальный штамм обладает способностью метилировать ДНК; для этого процесса характерна такая же специфичность в отношении последовательностей ДНК, как и для рестрикции. Метилаза добавляет метильные группы к адениновым или цитозиновым остаткам в том же сайте, в котором связывается рестрикционный фермент. В результате метилирования сайт становится устойчивым к рестрикции. Следовательно, метилирование защищает ДНК от разрезания.

### **Классификация рестриктаз**

Различают 3 основных класса рестриктаз: 1, 2 и 3.

Все рестриктазы узнают на двуспиральной ДНК строго определенные последовательности, но рестриктазы 1-го класса осуществляют разрывы в произвольных точках молекулы ДНК, а рестриктазы 2-го и 3-го классов узнают и расщепляют ДНК в строго определенных точках внутри сайтов узнавания или на фиксированном от них расстоянии.

Ферменты типов 1 и 3 имеют сложную субъединичную структуру и обладают двумя типами активностей: модифицирующей (метилирующей) и АТФ-зависимой эндонуклеазной.

Ферменты второго класса состоят из 2 отдельных белков: рестрицирующей эндонуклеазы и модифицирующей метилазы, поэтому в генной инженерии используются исключительно ферменты 2-го класса. Они нуждаются в ионах магния в качестве кофакторов.

В настоящее время выделено более 500 рестриктаз класса 2, однако среди ферментов, выделенных из различных микроорганизмов, встречаются такие, которые узнают на ДНК одни и те же последовательности. Такие пары или группы называют изошизомерами. Различают истинную изошизомерию, когда ферменты узнают одну и ту же последовательность нуклеотидов и разрывают ДНК в одних и тех же точках, и ложную, когда ферменты, узнавая один и тот же сайт на ДНК, производят разрывы в разных точках в пределах того же сайта. Большинство рестриктаз класса 2 узнают последовательности, содержащие от 4 до 6 нуклеотидных пар, поэтому рестриктазы делят на мелко- и крупнощепящие. Мелкощепящие рестриктазы узнают тетра- и пентануклеотиды и вносят в молекулы гораздо больше разрывов, чем крупнощепящие, узнающие последовательность из шести нуклеотидных пар. Это связано с тем, что вероятность встречаемости определенной последовательности из четырех нуклеотидов гораздо выше, чем последовательности из шести нуклеотидов. К мелкощепящим относятся рестриктазы Hpa II и Alu (из *Arthrobacter luteus*), к крупнощепящим – Eco R I (из *Escherichia coli*) и Hind III. Если предположить, что участки узнавания рестриктаз распределены вдоль цепи ДНК случайно, то мишень для ферментов, узнающих последовательность (сайт) из четырех нуклеотидов, должна встречаться в среднем 1 раз через каждые 256 пар оснований, а для ферментов, узнающих шесть нуклеотидов, встречаться через 4096 пар оснований. Если сайт рестрикции окажется внутри гена, то обработка ДНК-рестриктазой приведет к его инактивации. Вероятность такого события очень велика при обработке мелкощепящими рестриктазами и незначительна при применении крупнощепящих эндонуклеаз. Поэтому с целью получения неповрежденного гена расщепление проводят поочередно несколькими крупнощепящими рестриктазами, либо при-

меняют прием «недорестрикции», т.е. рестрикцию проводят в таких условиях, когда происходит расщепление лишь в одном сайте.

Рестриктазы по-разному расщепляют ДНК (рис. 36). Одни вносят разрывы по оси симметрии узнаваемой последовательности (Hpa I, Ssp I). Другие – со сдвигом, со «ступенькой» (Pst I).

В первом случае образуются так называемые «тупые» концы, а во втором – «липкие», то есть фрагменты имеют на своих концах однонитевые взаимно комплементарные участки длиной в четыре нуклеотида. Такие фрагменты особенно удобны для создания рекомбинантных ДНК.

### ***Обратная транскриптаза***

Обратная транскриптаза используется для транскрипции м-РНК в комплементарную цепь ДНК. При изучении ретровирусов, геном которых представлен молекулами одноцепочечной РНК, было обнаружено, что в процессе внутриклеточного развития ретровирус проходит стадию интеграции своего генома в виде двухцепочечной ДНК в хромосомы клетки-хозяина. В 1964 г. Темин выдвинул гипотезу о существовании вирусспецифичного фермента, способного синтезировать на РНК-матрице комплементарную ДНК. Усилия, направленные на выделение такого фермента, увенчались успехом, и в 1970 г. Темин с Мизутани, а также независимо от них Балтимор, открыли искомый фермент в препарате внеклеточных вирионов вируса саркомы Рауса. Данная РНК-зависимая ДНК-полимераза получила название обратная транскриптаза, или ревертаза.

Наиболее детально изучена ревертаза ретровирусов птиц. Каждый вирион содержит около 50 молекул этого фермента. Обратная транскриптаза состоит из двух субъединиц: а (65 кДа) и b (95 кДа), присутствующих в эквимольном количестве. Обратная транскриптаза обладает, по крайней мере, тремя ферментативными активностями:

- 1) ДНК-полимеразной, использующей в качестве матрицы как РНК, так и ДНК;
- 2) активностью РНКазы Н, гидролизующей РНК в составе гибрида РНК–ДНК, но не одно- или двухцепочечную РНК;
- 3) ДНК-эндонуклеазной активностью.

Первые две активности необходимы для синтеза вирусной ДНК, а эндонуклеаза, по-видимому, важна для интеграции вирусной ДНК в геном клетки-хозяина. Очищенная обратная транскриптаза синтезирует ДНК как на РНК-, так и на ДНК-матрицах. Чтобы начать синтез, ревертазе, как и другим полимеразам, необходим короткий двухцепочечный участок (праймер). Праймером может служить одноцепочечный сегмент как РНК, так и ДНК, которые в процессе

реакции оказываются ковалентно связанными с новосинтезированной цепью ДНК.

Обратную транскриптазу преимущественно используют для транскрипции матричной РНК в комплементарную ДНК (кДНК).

### **Лигазы**

В 1961 г. Мезельсон и Вейгл на примере фага I показали, что рекомбинация включает разрыв и последующее воссоединение молекул ДНК. Это положило начало поискам фермента, участвующего в сшивании фрагментов ДНК. В 1967 г. такой фермент был найден и получил название ДНК-лигаза. Он катализирует синтез фосфодиэфирной связи в 2-х цепочечной молекуле нуклеиновой кислоты.

Иными словами, ДНК-лигазы сшивают рядом расположенные нуклеотиды, образуя связь между остатками сахаров. ДНК-лигазы абсолютно необходимы в процессах репарации ДНК, в процессах репликации – при удвоении цепи ДНК.

Существует 2 типа ДНК-лигаз, отличающихся по потребностям в кофакторах и способу действия. ДНК-лигаза *E. coli* в качестве кофактора использует дифосфопиридиннуклеотид, а лигаза фага T4 – АТФ в присутствии  $Mg^{2+}$ . Лигаза фага T4 более универсальна, так как помимо лигирования липких концов способна катализировать реакцию воссоединения двухцепочечных фрагментов ДНК с тупыми концами. Она используется чаще.

### **ДНК-полимераза I *E. coli***

ДНК-полимераза I *E. coli* (PolI) была обнаружена А. Корнбергом с сотрудниками в 1958 г. Этот фермент явился первой найденной полимеразой. Он представляет собой мономерную полипептидную цепь и имеет трёхдоменную структуру. Каждый домен белка обладает отдельной ферментативной активностью: N-концевой домен – 5'-3'-эксонуклеазной; С-концевой – 5'-3'-полимеразной; средний домен – 3'-5'-эксонуклеазной. Она способна связываться с одноцепочечными участками ДНК в количестве примерно одна молекула на 300 нуклеотидных остатков. Рассмотрим ферментативные активности ДНК-полимеразы I *E. coli*.

**5'-3'-полимеразная активность.** Для реакции необходимо наличие одноцепочечной ДНК-матрицы и комплементарного участку этой цепи фрагмента – праймера (затравки) с 3'-ОН концом.

**3'-5'-эксонуклеазная активность.** Одноцепочечная или двухцепочечная ДНК гидролизует с 3'-ОН конца. Необходимо подчеркнуть, что 3'-5'-нуклеаза расщепляет диэфирную связь только в неспаренных участках ДНК.

Две эти активности дополняют друг друга во время полимеразной реакции, поскольку в растущую цепь может включиться некомплементарный нук-

леотид. Однако полимераза не может присоединять нуклеотид к неправильно спаренному концу, образовавшемуся при её участии. На помощь приходит 3'-5'-экзонуклеаза, убирающая ошибочный нуклеотид, на место которого затем присоединяется правильный. 3'-5'-экзонуклеолитическая активность проявляется в направлении, обратном синтезу ДНК. Следовательно, важную роль играет 3'-5'-экзонуклеолитическая активность в обеспечении точности полимеризации.

**5'-3'-экзонуклеолитическая активность** деградирует одну цепь двухцепочечной ДНК, начиная со свободного 5'-конца. В отличие от 3'-5'-экзонуклеазы 5'-3'-экзонуклеаза расщепляет диэфирную связь только в спаренных участках двухцепочечной молекулы ДНК, более того она способна отщеплять с 5'-конца олигонуклеотиды длиной до десяти остатков. Скорость нуклеазного отщепления увеличивается на порядок при одновременно протекающей реакции полимеризации. При этом возрастает относительное количество олигонуклеотидов в продуктах гидролиза ДНК. Благодаря такому сочетанию ферментативных активностей ДНК-полимераза I *E. coli* играет важную роль в репарации повреждений ДНК *in vivo*.

### **Нуклеаза Bal31**

В 1975 г. Х. Грэй с соавторами, изучая внеклеточные нуклеазы *Alteromonas espejiana* Bal31, обнаружили фермент, который функционирует:

1) как экзонуклеаза, катализирующая удаление малых олигонуклеотидов или мононуклеотидов одновременно с 5'- и 3'-концов двухцепочечной ДНК, причем обе цепи ДНК деградируют примерно с одинаковой скоростью;

2) как эндонуклеаза, специфичная к одноцепочечной ДНК. Данный фермент получил название нуклеаза Bal31.

Способность нуклеазы Bal31 вызывать деградацию с концов одновременно обеих цепей молекулы ДНК привлекла к этому ферменту внимание исследователей. Оказалось, что образовавшиеся после обработки Bal31 фрагменты ДНК можно сшить с помощью ДНК-лигазы фага T4 с другими молекулами ДНК, имеющими тупые концы. Этот фермент используется при конструировании гибридных молекул ДНК, когда необходимо в их составе сблизить какие-либо функционально значимые генетические элементы.

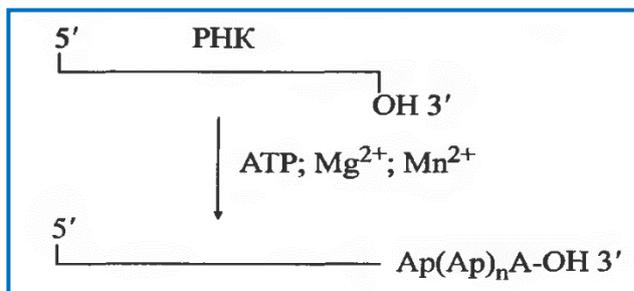
### **Концевая дезоксинуклеотидилтрансфераза**

В 1962 г. Ф. Боллум обнаружил в тимусе телёнка необычный фермент, названный концевой дезоксинуклеотидилтрансферазой, или **терминальной трансферазой**. Данный фермент катализирует последовательное присоединение дезоксинуклеотидов к 3'-ОН-концу молекулы ДНК. Субстратом терминальной трансферазы при использовании в качестве кофактора ионов  $Mg^{2+}$  является одноцепочечная ДНК с 3'-ОН- концом или двухцепочечная ДНК с выступающим одноцепочечным 3'-ОН-концом. При использовании в качестве

кофактора ионов  $Co^{2+}$  этот фермент может катализировать присоединение дезоксирибонуклеотидов к 3'-ОН концу двухцепочечной ДНК с тупыми концами или даже к 3'-ОН-концу двухцепочечной ДНК с выступающим одноцепочечным 5'-р-концом. При введении в реакцию, направляемую терминальной трансферазой, лишь одного типа дезоксирибонуклеотидов образуются молекулы ДНК, имеющие гомополимерные одноцепочечные 3'-концы.

### Поли(А)-полимераза *E. coli*

Данный фермент, открытый А. Сиппелом в 1973 г., катализирует присоединение к свободному 3'-ОН-концу одноцепочечных молекул РНК поли(А)-последовательностей (рис. 3).



Поли(А)-полимераза находит применение при подготовке молекул РНК к копированию с них комплементарных ДНК. Этот фермент можно использовать и для введения радиоактивной метки в 3'-конец РНК.

Кроме рассмотренных выше, в экспериментах по клонированию фрагментов ДНК и анализу структуры гибридных ДНК используют большой набор других ферментов нуклеинового обмена. К ним относятся полинуклеотидкиназа, щелочная фосфатаза, 5'-экзонуклеаза фага  $\lambda$ , экзонуклеаза III *E. coli*, рибонуклеазы, метилазы и др.

Все используемые при конструировании гибридных молекул ДНК ферменты должны быть высокоочищенными, так как даже незначительные посторонние нуклеазные загрязнения могут приводить к побочным реакциям и резко снижать эффективность получения целевых генетических конструкций. Поэтому изучение ферментов, разработка методов их глубокой очистки, а также поиск новых ферментов, специфически действующих на нуклеиновые кислоты, активно продолжаются. В совокупности многочисленные ферменты, имеющие в качестве субстрата катализируемых ими реакций нуклеиновые кислоты, составляют биохимическую базу экспериментов по конструированию *in vitro* и анализу гибридных молекул ДНК.

### Третий этап. Перенос генов в клетки организма-реципиента

Передача генов, встроенных в плазмиду, осуществляется путем трансформации или конъюгации. Если гены встраиваются в геном вируса, наиболее распространенным способом передачи информации служит трансформация.

**Трансформация** – это перенос свободной ДНК, в том числе и плазмидной, в реципиентную клетку, вызывающий изменение признаков клетки. При

этом происходят рекомбинация и интегрирование однонитевого фрагмента ДНК в хромосому реципиента или какую-либо внехромосомную генетическую единицу.

Путем **конъюгации** происходит перенос лишь некоторых плазмид (конъюгативных). В этом случае информация перекачивается из одной клетки бактерии (мужской, донорной) в другую клетку (женскую, реципиентную) по половым ворсинкам, представляющим собой белковые трубочки.

Под **трансдукцией** понимают передачу всего набора генов вируса или фага, приводящую к развитию вирусных частиц в клетке.

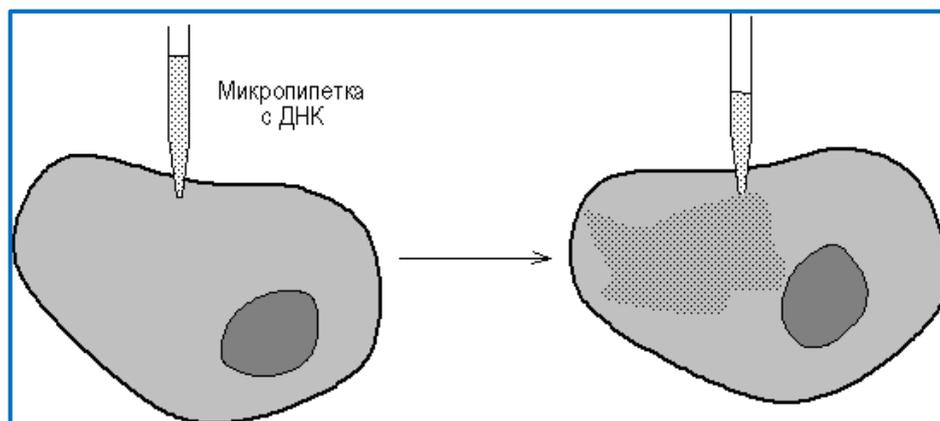
### **Способы прямого введения гена в клетку**

Ввести рекомбинантный ген в клетку можно 2 способами: используя вектора или путем прямого введения.

Прямое введение гена в клетку осуществляют несколькими способами:

**Трансфекция.** При трансфекции ДНК адсорбируется на кристаллах фосфата кальция (Грэхем Ван дер Эб, 1973). Образуются частицы кальциевого преципитата. Они поглощаются клеткой путем фагоцитоза.

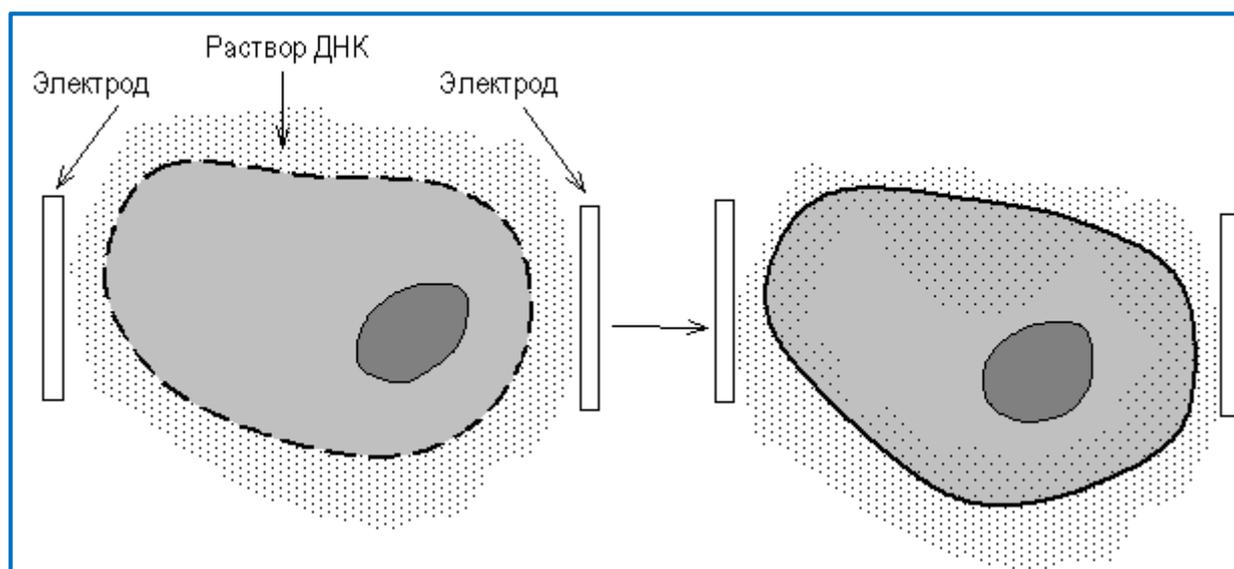
**Микроинъекция.** Микроинъекция ДНК в клетки млекопитающих стала возможной с появлением прибора для изготовления микропипеток диаметром 0.1–0.5 микрона и микроманипулятора. Так, плазмиды, содержащие фрагмент вируса герпеса с геном тимидинкиназы (ТК) и плазмиду pBR322, были инъецированы в ТК-клетки, и было показано, что ТК-ген проник в ядра и нормально в них реплицировался. Метод введения ДНК с помощью микроинъекций был разработан в начале 70-х гг. Андерсоном и Диакумакосом. В принципе, при наличии хорошего оборудования можно за 1 час инъецировать 500–1000 клеток, причем в лучших экспериментах в 50 % клеток наблюдается стабильная интеграция и экспрессия инъецированных генов. Преимущество описываемого метода заключается также в том, что он позволяет вводить любую ДНК в любые клетки, и для сохранения в клетках введенного гена не требуется никакого селективного давления.



Введение ДНК путем микроинъекции

**Электропорация.** Электропорация основана на том, что импульсы высокого напряжения обратимо увеличивают проницаемость биомембран. В среду для электропорации добавляют клетки и фрагменты ДНК, которые необходимо ввести в клетки. Через среду пропускают высоковольтные импульсы (напряжение 200–350 В, длительность импульса 54 мс), приводящие к образованию пор (электропробой) в цитоплазматической мембране, время существования и размер которых достаточны, чтобы такие макромолекулы, как ДНК, могли из внешней среды войти в клетку в результате действия осмотических сил. При этом объем клетки увеличивается.

Напряженность электрического поля и продолжительность его действия, концентрации трансформирующей ДНК и реципиентных клеток для каждой системы клеток подбирают экспериментально, с тем чтобы достичь высокого процента поглощения ДНК выжившими клетками. Показано, что в оптимальных условиях электропорации количество трансформантов может достигать 80 % выживших клеток.



Метод электропорации

**Метод «мини-клеток».** «Мини-клетки» получают путем блокирования донорных клеток митозе колцемидом. При продолжительной обработке клеток колцемидом в них вокруг каждой хромосомы формируется новая ядерная мембрана. Обработка цитохалазином В и центрифугирование приводит к образованию мини-клеток, представляющих микроядра, инкапсулированные в цитоплазматическую мембрану.

Полученные мини-клетки очень чувствительны к разного рода воздействиям, поэтому для слияния подбирают специальные мягкие условия. Метод трудный, капризный, эффективность низкая –  $10^{-6}$ – $10^{-7}$ .

**Упаковка в липосомы.** Упаковка в липосомы используется для защиты экзогенного генетического материала от разрушающего действия рестриктаз.

Липосомы – сферические оболочки, состоящие из фосфолипидов. Получают их путем резкого встряхивания смеси водного раствора и липидов, либо обрабатывая ультразвуком водные эмульсии фосфолипидов. Липосомы, состоящие из фосфатидилсерина и холестерина, наиболее пригодны для введения ДНК в клетки животных и растений. Системы переноса с помощью липосом низкотоксичны по отношению к клеткам.

**Электронная пушка. Метод биологической баллистики (биолистики)** является одним из самых эффективных на сегодняшний день методов трансформации растений, особенно однодольных.

Суть метода заключается в том, что на мельчайшие частички вольфрама, диаметром 0,6–1,2 мкм, напыляется ДНК вектора, содержащего необходимую для трансформирования генную конструкцию. Вольфрамовые частички, несущие ДНК, наносятся на целлофановую подложку и помещаются внутрь биолиственной пушки. Каллус или суспензия клеток наносится в чашку Петри с агаризированной средой и помещается под биолистическую пушку на расстоянии 10–15 см. В пушке вакуумным насосом уменьшается давление до 0,1 атм. В момент сбрасывания давления вольфрамовые частички с огромной скоростью выбрасываются из биолиственной пушки и, разрывая клеточные стенки, входят в цитоплазму и ядро клеток.

Обычно клетки, располагающиеся непосредственно по центру, погибают из-за огромного количества и давления вольфрамовых частиц, в то время как в зоне 0,6–1 см от центра находятся наиболее удачно протрансформированные клетки. Далее клетки осторожно переносят на среду для дальнейшего культивирования и регенерации.

С помощью биолиственной пушки были протрансформированы однодольные растения, такие как кукуруза, рис, пшеница, ячмень. При этом были получены стабильные растения-трансформанты. Кроме успехов в получении трансгенных однодольных, биолиственная трансформация применяется для прямого переноса ДНК в эмбрионную пыльцу и дальнейшего быстрого получения трансгенных дигаплоидных растений, которые являются важным этапом в селекционной работе. В настоящее время этим методом была проведена трансформация растений табака, и после регенерации гаплоидных растений получены стабильные трансформанты.

## **Четвертый этап. Отбор клонов, несущих нужную рекомбинационную молекулу**

### ***Методы идентификации клонов, содержащих рекомбинантные молекулы***

В большинстве экспериментов по молекулярному клонированию используется сложная смесь фрагментов ДНК. Существуют специальные приемы, позволяющие отобрать клоны, содержащие рекомбинантные молекулы ДНК. Например, при применении фазмид дают урожай исключительно фаговые корпускулы, в головки которых пакуются рекомбинантные молекулы. При применении плазмид отбирают клоны с рекомбинантной ДНК по инаktivации одного из маркеров плазмид и т.д. Гораздо сложнее найти среди рекомбинантов клон, несущий ген.

#### ***Тест на комплементацию***

Основан на изменении фенотипа клетки под влиянием синтезируемого белка либо просто на свойствах самого белка.

Например, если необходимо изолировать гены *E. Coli*, ответственные за биосинтез какой-либо аминокислоты, трансформируя гибридные плазмиды в ауксотрофные по биосинтезу аминокислоты мутанты и получая прототрофные клоны.

Используется обычно при «самоклонировании», то есть при переносе генов на многолинейных плазмидах в тот же микроорганизм, и требует наличия штаммов с хорошо охарактеризованными мутациями искомого гена.

#### ***Метод прямой радиоиммунологической детекции колоний***

Колонии клеток, несущие рекомбинантные молекулы, лизируют на поверхности агара, а затем отпечатывают на поливиниловую пластику, на которой адсорбированы антитела. После отмывки диски обрабатывают мечеными I125 антителами к белку искомого гена. Таким образом, образуется комплекс антигена с двумя молекулами антитела, одна из которых мечена иодом, а вторая присоединяется к пластинке. Образование комплекса тестируется радиоавтоматически.

Клоны могут быть идентифицированы по первичной структуре ДНК или по характеру белка, синтезирующего в подходящей системе (ооциты лягушки, бесклеточные экстракты). Тестирование первичной структуры ДНК осуществляется меченой очищенной мРНК. Трудности метода связаны со сложностью получения гомогенных препаратов мРНК. Кроме того, клоны, дающие позитивный ответ при гибридизации, не обязательно содержат нужный ген или его часть.

### ***Гибридизационная селекция***

Денатурируют клонированную ДНК, иммобилизируют ее на твердой матрице и гибридизируют ее с препаратом мРНК. Дуплекс ДНК-РНК нагревают с препаратом мРНК, которую затем добавляют в бесклеточные белоксинтезирующие системы для трансляции. Продукты трансляции идентифицируют или по биологической активности, или по иммуноприцептацией. Последний метод чрезвычайно трудоемок, но позволяет обнаружить в библиотеке клоны, содержащие кДНК, мРНК, которая представлена в количестве 0,03–0,01 % от суммарной клеточной мРНК.

Если известна первичная структура гена или кодируемого им белка, или хотя бы их фрагментов, то для скрининга клонов можно использовать синтетические олигонуклеотиды – зонды. Зонды не должны быть короче 14–15 п.о. Лучше брать 2 зонда одновременно к различным участкам одного и того же гена. В силу вырожденности кода, если известна только аминокислотная последовательность, приходится синтезировать набор олигонуклеотидов, которые будут полностью комплементарны к искомому гену.

### **Контрольные вопросы**

1. Опишите типовой эксперимент в генной инженерии. Какие существуют источники ДНК для клонирования?
2. Ферменты генетической инженерии: обратная транскриптаза и лигаза.
3. Что такое эндонуклеазы рестрикции и почему они так важны для технологии рекомбинантных ДНК?
4. Бактериальные плазмиды и вирусы как векторы для введения гена в клетку.
5. Что такое космиды, фазмиды. Какими преимуществами как вектор обладает бактериофаг М13?
6. Вироиды и транспозоны как векторы для введения гена в клетку.
7. Опишите способы прямого введения гена в клетку. Трансфекция. Микроинъекция. Электропорация.
8. Опишите способы прямого введения гена в клетку. Метод «миниклеток». Упаковка в липосомы. Метод биологической баллистики.

## РАЗДЕЛ 3. ПРИЛОЖЕНИЕ BIOTEХНОЛОГИИ В СФЕРАХ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ

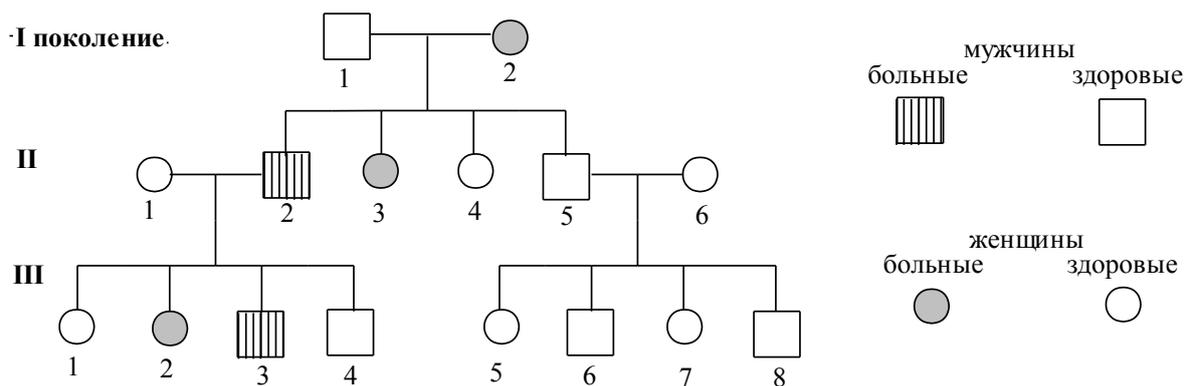
### 3.1. Методы генной инженерии в медицине (генная терапия)

Состояние здоровья человека зависит от многих факторов: его образа жизни, биологии, условий окружающей среды, качества системы здравоохранения и т.д. За последние десятилетия достигнуты значительные успехи в диагностике, лечении и профилактике инфекционных болезней, поэтому более очевидным стало влияние генетических факторов, особенно в развитых странах. Наследственными являются свыше 1000 болезней человека. Большинство из них очень редки ( $-10^{-5}$ ), но некоторые встречаются относительно часто ( $-10^{-4}$ ). Многие наследственные заболевания человека обуславливаются мутациями в единственном гене, однако ряд сложных патологий, например рак, определяются мутациями в нескольких генах. В том случае, когда имеется полное, точное и последовательное описание симптомов заболевания (фенотипа), определяемого единственным геном, генетическую природу заболевания можно установить, исходя из типа его наследования в семьях, представленными несколькими поколениями.

Существуют 4 основных типа наследования:

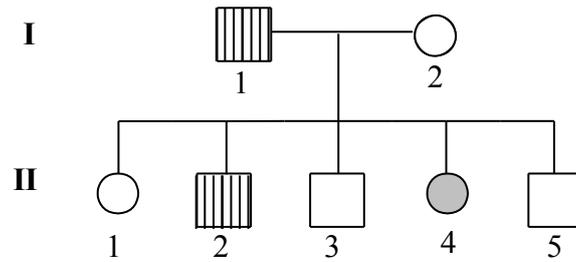
**1. Аутосомно-доминантный.** Характерные признаки:

- 1) симптомы заболевания проявляются в последующих поколениях в случае полной пенетрантности (т.е. если каждый генотип проявляется фенотипически);
- 2) лица мужского и женского пола поражаются с одинаковой частотой;



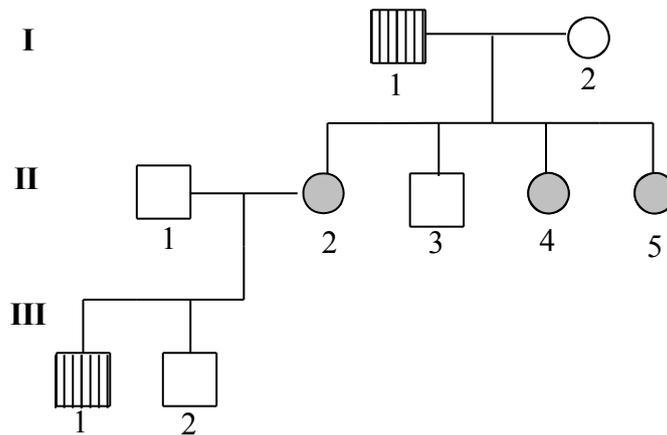
**2. Аутосомно-рецессивный.** Характерные признаки:

- 1) у здоровых родителей могут появиться больные дети;
- 2) лица мужского и женского пола поражаются с одинаковой частотой;
- 3) если больны оба родителя, то больны и все их дети;



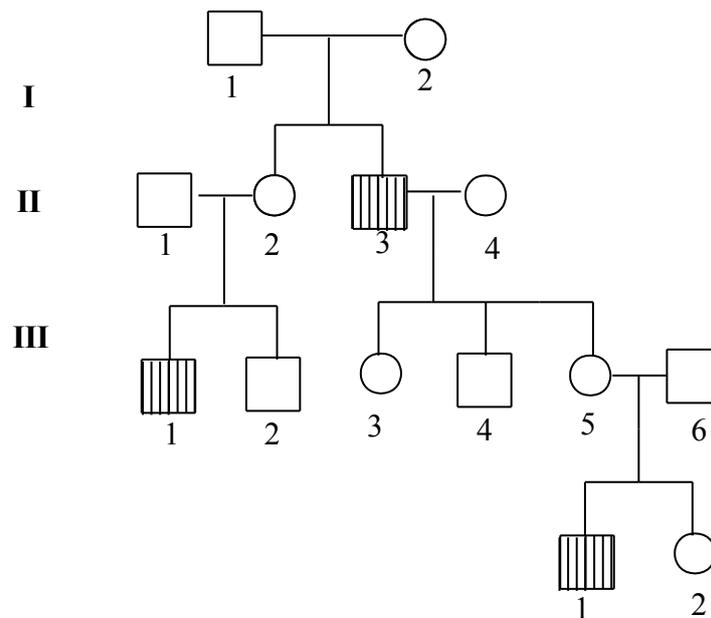
**3. X-сцепленный доминантный.** Характерные признаки:

- 1) в случае полной пенетрантности больные присутствуют в каждом поколении;
- 2) больны все дочери пораженного мужчины, а все его сыновья здоровы;
- 3) в последующих поколениях часто проявляется тип наследования «от отца – к дочери – к ее сыну»;
- 4) число больных женского пола может быть больше, чем мужского;



**4. X-сцепленный рецессивный.** Характерные признаки:

- 1) у здоровых родителей могут рождаться больные дети;
- 2) нет прямой передачи заболевания от отца к сыну;
- 3) больных мужского пола больше, чем женского.



Термин «аутосомный» относится к 22 парам неполовых хромосом (аутосом) человека, а термин «X-сцепленный» указывает на локализацию гена на X-хромосоме. Доминантным называют такое состояние, когда для проявления заболевания достаточно присутствия одного мутантного аллеля данного гена, а в случае рецессивного заболевания дефектными должны быть оба аллеля. У мужчин в ядре присутствует одна X-хромосома, поэтому большинство X-сцепленных генов независимо от того, являются они доминантными или рецессивными, приводят к проявлению заболевания.

Анализ родословных чрезвычайно полезен для установления типа наследования специфического состояния, однако не дает никакой информации об ассоциированном с данным заболеванием гене, о биологической основе нарушения или – в случае аутосомного заболевания – о хромосомной локализации гена. Более того, не всегда можно определить, является ли заболевание наследственным. Успех в установлении корреляции между нормальным или патологическим фенотипом и соответствующим ему генотипом в значительной степени зависит от того, удастся ли идентифицировать и изолировать (клонировать) конкретный ген. Зная нуклеотидную последовательность гена, можно определить, какую функцию выполняет его продукт в норме, как нарушается эта функция в результате мутации, в какой степени различные мутации в разных экзонах ответственны за проявление заболевания. Чем полнее будут наши знания о функциях гена, ответственного за то или иное заболевание, тем более эффективную схему лечения мы сможем предложить.

Как правило, при идентификации генов, ассоциированных с различными заболеваниями, нельзя обойтись без генетических и физических карт, а построение таких карт, в конечном счете, поможет определить нуклеотидную последовательность гена.

довательность всего генома человека. *Генетическая карта* (карта сцепления) показывает расположение определенных сайтов (локусов) вдоль хромосомы. Для построения полных карт сцепления необходимо, чтобы локусы каждой хромосомы были представлены часто встречающимися аллелями, и чтобы можно было легко идентифицировать каждый из них. *Физическая карта* – это набор упорядоченных клонов ДНК, охватывающих всю хромосому или какую-то область. На практике эти клоны перекрываются, образуя последовательность фрагментов, называемую *контигом*. Длина участка, охватываемого контигом, выражается в парах нуклеотидов. Физическая карта, состоящая из контигов, служит основой при построении окончательной физической карты, которая представляет собой полную нуклеотидную последовательность хромосомы. Полная нуклеотидная последовательность каждой из хромосом человека уже определена. Более того, идентифицирована значительная часть генов, определена их структура.

Долгое время медицинская генетика занималась одной проблемой: установлением генетических наследственных заболеваний человека. Нормальная работа организма обеспечивается функциями множества взаимосвязанных генов, и мутация даже в одном из них может иметь самые разные последствия. Так, мутация, в результате которой изменяется активность того или иного фермента, может приводить к накоплению токсичного субстрата или дефициту соединения, необходимого для нормального функционирования клетки, а мутация в гене, кодирующем структурный белок, приводит к серьезным нарушениям на уровне клеток, тканей или органов. Кроме того, мутация в гене, экспрессирующемся в одной ткани, может сказаться самым серьезным образом на совсем другой ткани и привести к появлению множества симптомов. Конечной целью медико-генетических исследований является создание методов лечения всех наследственных заболеваний.

После того как были установлены молекулярные основы трансформации бактерий (переноса генов из одного штамма в другой), у ученых появилась надежда, что аналогичный механизм – введение нормальных генов в дефектные соматические клетки – можно будет использовать для лечения наследственных заболеваний человека. Прежде чем новый лекарственный препарат будет разрешен к применению, он должен пройти четыре строго оговоренных стадии проверки.

1. Доклинические испытания, которые включают многочисленные эксперименты, проводимые *in vitro* и на лабораторных животных.

2. I фаза клинических испытаний проводится на небольшом числе (6–10) пациентов и часто имеет целью проверку безопасности препарата.

3. II фаза клинических испытаний проводится на большом числе пациентов и имеет целью проверку эффективности действия препарата.

4. III фаза клинических испытаний проводится с привлечением большого числа пациентов и включает исчерпывающий анализ надежности и эффективности препарата, при этом используется информация, полученная на предыдущих этапах.

Поскольку генная терапия представляет собой новое направление, а заболевания, которые предполагают лечить с ее помощью, столь различны, рассматривают множество разных подходов. В настоящее время все исследования по генной терапии направлены на коррекцию генетических дефектов соматически, а не половых (зародышевых) клеток. Это объясняется этическими и чисто техническими причинами, а также соображениями безопасности: ведь ДНК, введенная в половые клетки, передавалась бы последующим поколениям.

В самом общем смысле под генной терапией соматических клеток человека понимают коррекцию специфического наследственного заболевания путем введения в клетку-мишень функционального экспрессирующегося гена. Однако за этим простым определением скрывается целый ряд проблем. Например, как получить доступ к клеткам, предназначенным для коррекции? Как осуществить доставку терапевтического гена? Какая доля клеток-мишеней должна получить такой ген, чтобы болезнь отступила? Необходим ли точный контроль транскрипции введенного гена для обеспечения ее эффективности? Не вызовет ли избыточная экспрессия введенного гена побочных эффектов? Будут ли модифицированные клетки поддерживаться бесконечно или потребуются повторные введения?

В молекулярной медицине развиваются два направления.



Генная терапия делится на:

- *Заместительная* генотерапия – ввод в клетку неповрежденного гена. Внесенная копия заменит по функциям сохранившийся в геноме больного дефектный ген.

- *Корректирующая* генотерапия – замена дефектного гена нормальным в результате рекомбинации.

Классификация генной терапии

1) по типу клеток-мишеней:

- соматическая;
- фетальная (генная терапия плода).

2) по цели воздействия:

- позитивная (компенсация экспрессии гена);
- негативная (подавление функций гена).

В генной терапии используются в основном три стратегии:

- ✓ Одна из них используется в тех случаях, когда клетки, которые нужно вылечить, потеряли функцию какого-либо гена, и для лечения нужно эту функцию *восстановить*. Тогда в клетку организма, которая страдает от этой потери функции, нужно доставить ген, способный обеспечивать недостающую функцию. Это приходится делать, например, при рецессивных наследственных заболеваниях.

- ✓ Наоборот, часто болезнь вызывается избыточной функцией, несвойственной нормальной клетке. Это происходит при инфекциях или опухолевых трансформациях. Тогда генному терапевту следует озаботиться тем, чтобы эту излишнюю функцию *подавить*. Эти две стратегии можно считать истинно геннотерапевтическими. Они нацелены на коррекцию дефекта клетки генными модификациями этой же клетки.

- ✓ К геннотерапевтическим подходам теперь относят также и такие подходы, когда клетки модифицируют, чтобы *усилить иммунный ответ организма* на нежелательные явления, вызванные инфекцией или возникновением опухолей. Модификация также осуществляется введением новой генетической информации либо в клетки, против которых хотят увеличить иммунный ответ, либо в клетки иммунной системы, с помощью которых хотят усилить этот эффект. Хотя, строго говоря, эта стратегия не совсем вписывается в классическое понятие генной терапии.

### ***Генная терапия ex vivo***

Генная терапия *ex vivo*, как правило, включает следующие этапы.

1. Получение клеток от больного.
2. Исправление генетического эффекта с помощью переноса нужного гена в изолированные клетки.
3. Отбор и наращивание генетически «исправленных» клеток.
4. Инфузия или трансплантация этих клеток пациенту.

Использование собственных клеток пациента (аутологических клеток) гарантирует, что после инфузии или трансплантации у него не разовьется иммунный ответ.

Необходимо, чтобы процедура переноса генов, используемая для генной терапии *ex vivo*, была эффективной, а терапевтический ген стабильно поддерживался и непрерывно экспрессировался. Этим условиям отвечают векторы, полученные на основе мышинных ретровирусов. Но ретровирусы имеют существенный недостаток – они могут приводить к злокачественной трансформации клеток. Такую вероятность необходимо уменьшить, а лучше полностью исключить.

Геном ретровируса дикого типа представлен двумя идентичными одноцепочечными молекулами РНК, каждая из которых состоит из шести участков: длинного концевой повтора (5'-LTR, от англ. *long terminal repeat*; некодирующей последовательности пси<sup>+</sup> ( $\psi^+$ ), необходимой для упаковки РНК в вирусную частицу; трех генов, кодирующих структурный белок внутреннего капсида (*gag*), белок, обладающий функциями обратной транскрипции и интегразы (*pol*), и белок оболочки (*env*); 3'-LTR- последовательности.

Жизненный цикл ретровируса включает следующие стадии:

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

Для получения ретровирусного вектора полноразмерную ДНК ретровируса встраивают в плазмиду, с помощью эндонуклеазного расщепления удаляют большую часть гена *gag* и гены *pol* и *env*, оставляя 5'-концевой участок гена *gag* 5'- и 3'-LTR, а затем рядом с  $\psi^+$ -областью встраивают терапевтический ген, транскрипция которого будет контролироваться 5'-LTR-промотором; при необходимости можно встроить и маркерный селективный ген с собственным промотором. Такая конструкция позволяет экспрессировать оба клонированных гена. Максимальный размер ДНК-вставки, которую может переносить ретровирусный вектор, составляет примерно 8 т.п.н.

В «пакующей» клеточной линии не образуются компетентные по репликации ретровирусные частицы дикого типа, способные встраиваться в гены и приводить к неконтролируемой пролиферации некоторых клеток (т.е. к превращению их в раковые клетки). Это весьма существенно, особенно если частицы ретровирусного вектора предполагается использовать для генной терапии соматических клеток человека. В качестве меры предосторожности все же проводят регулярное тестирование готовых ретровирусных векторов, с тем чтобы выявить ретровирусы дикого типа. Кроме того, в «пакующей» клеточной линии нуклеотидные последовательности ретровируса и вектора локализованы в трех различных областях хромосомы, что делает весьма маловероятной возможность последовательных рекомбинационных событий, которые могли бы привести к образованию компетентного по репликации ретровируса.

Ретровирусы активно инфицируют реплицирующиеся клетки. Для переноса генов в интенсивно растущие клетки-мишени последние обрабатывают очищенными частицами упакованного ретровирусного вектора либо проводят их совместное культивирование с производящей его клеточной линией, а затем осуществляют дифференциальную селекцию для разделения клеток-мишеней и «пакующих» клеток.

Трансдуцированные клетки-мишени (те, в которые при помощи вируса была перенесена невирусная ДНК) тестируют, чтобы удостовериться, что:

- 1) в них синтезируется продукт терапевтического гена;
- 2) не образуются компетентные по репликации ретровирусы;
- 3) ДНК ретровирусного вектора не встроилась в сайт, изменяющий способность клеток к росту или препятствующий их нормальному функционированию. После тестирования клетки наращивают в больших количествах и с разными интервалами вводят пациенту.

### ***Генная терапия in vivo***

Генная терапия *in vivo* предполагает доставку «терапевтического» гена непосредственно в клетки определенной ткани пациента. Ретровирусные векторы проникают только в делящиеся клетки-мишени, однако во многих тканях, на которые направлена генная терапия, большинство клеток не делится. Поэтому были разработаны разнообразные вирусные и невирусные системы доставки «терапевтических» генов, учитывающие большое число потенциальных тканей-мишеней (кожа, мышцы, легкие, мозг, толстая кишка, селезенка, печень, клетки крови) и расположение их в организме человека. «Идеальная» система доставки должна обеспечивать высокую эффективность поглощения «терапевтического» гена клетками-мишенями, минимальность его внутриклеточного разрушения при транспорте в ядро и поддержание уровня экспрессии, достаточного для облегчения состояния больного.

## **Вирусные системы доставки генов**

1. *Ретровирусные векторы.* Вектор может переносить не более 3,5 т.п.н. ДНК, но и длина большинства потенциальных «терапевтических» кДНК и генов – супрессоров опухолей составляет 0,5–2 т.п.н. В ретровирусную векторную систему внесены дополнительные усовершенствования: увеличено число образующихся вирусных частиц, повышена эффективность трансдукции, осуществлена генноинженерная модификация, обеспечивающая их проникновение в неделящиеся клетки, повышена специфичность инфекции. В последнем случае геном ретровирусного вектора упаковывается в оболочку другого вируса, белок которой и определяет специфичность связывания ретровируса и спектр инфицируемых им клеток. Это явление называется фенотипическим смешиванием.

2. *Аденовирусные векторы.* Аденовирусы инфицируют неделящиеся клетки человека и широко используются в качестве живых вакцин, которые предотвращают респираторные инфекции и гастроэнтериты, не оказывая побочного действия. Эти свойства делают аденовирусы перспективными для доставки генов в клетки-мишени.

3. *Векторы на основе аденоассоциированных вирусов.* Аденоассоциированные вирусы (ААВ) – это небольшие непатогенные вирусы человека с одноцепочечным ДНК-геномом (4,7 т.п.н.), который может интегрировать в специфический сайт 19-й хромосомы. Такое название они получили потому, что для продуктивной инфекции им необходимы белки другого вируса (вируса-помощника), например аденовируса. После того как ААВ попадает в ядро, его геном с помощью полимераз клетки-хозяина преобразуется в двуцепочечную ДНК и транскрибируется.

4. *Векторы на основе вируса простого герпеса.* В природе существуют вирусы, уже обладающие сродством к определенному типу клеток. Так, вирус простого герпеса 1 типа (HSV) инфицирует нейроны и персистирует в них, часто вызывая у человека так называемые «простудные» высыпания, а иногда – энцефалит с летальным исходом. Вирус присутствует в нейронах в латентной форме, а при стрессах и гормональных нарушениях иницируется литический цикл. Существует множество заболеваний, поражающих центральную и периферическую нервную систему: опухоли, метаболические и иммунные нарушения, нейродегенеративные заболевания (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона). Неврологические заболевания, как правило, бывают хроническими и приводят к госпитализации больного чаще, чем все остальные болезни вместе взятые. Вследствие тропности HSV к нервным клеткам он является подходящим вектором для генной терапии таких заболеваний. Геном HSV представляет собой двуцепочечную молекулу ДНК длиной 152 т.п.н. Капсид вируса сливает-

ся с мембраной нейрона, и его ДНК транспортируется в ядро. Репродуктивный цикл вируса состоит из литической (репликация ДНК, образование вирусных частиц) и латентной (конденсация вирусного генома и активация как минимум двух так называемых латентно-ассоциированных промоторов) фаз.

### **Невирусные системы доставки генов**

В опосредованной вирусами доставке генов участвуют клеточные рецепторы, с помощью которых вектор проникает в клетку-мишень, не разрушаясь лизосомными ферментами, и векторная ДНК попадает в ядро. Однако вирусные векторы имеют ряд недостатков: они дорогостоящие и часто обладают ограниченной клонирующей емкостью, что не позволяет регулировать экспрессию «терапевтического» гена с помощью тканеспецифичных последовательностей. Кроме того, вирусные белки могут вызвать воспалительную реакцию, что исключает повторное введение вектора. Поэтому были разработаны невирусные доставки генов.

Самая простая из них – прямое введение ДНК-конструкций в клетки-мишени. Однако применение этого подхода ограничивается тем, что не все ткани доступны для инъекций, а, кроме того, нужны большие количества ДНК. Можно бомбардировать с помощью генного «ружья» клетки кожи или – через надрез – клетки подкожной опухоли конъюгированными с ДНК частицами золота диаметром 1–3 мкм. Введенные таким образом «терапевтические» гены экспрессируются в тканях-мишенях, а их продукты поступают в кровь. Это может облегчить доставку терапевтического белка в ткань-мишень, прямой доступ к которой затруднен. Однако большинство белков, в норме не присутствующих в крови, инактивируются или разрушаются ее компонентами. Для решения этой проблемы нужны дополнительные исследования.

Проникновение ДНК через клеточную мембрану можно облегчить, окружив генетическую конструкцию искусственной липидной оболочкой, образующей липидную сферу (липосому) с водным содержимым. Созданы липосомы с самыми разными свойствами, например катионные липосомы, поверхность которых заряжена положительно; они связываются с отрицательно заряженной молекулой ДНК, образуя ДНК-липидный комплекс (липоплекс). Липоплексы легко образуются, относительно нетоксичны и неиммуногенны, но эффективность переноса генов с их помощью невысока, поскольку большая часть ДНК после попадания в клетку захватывается лизосомами и разрушается.

Для доставки в клетки крупных генетических конструкций (>10 т.п.н.) с помощью эндосомного клеточного транспорта, позволяющего избежать лизосомного разрушения ДНК, образуют конъюгат ДНК с другими молекулами. Для этого поли-L-лизин ковалентно сшивают с молекулой, связывающейся со специфическим клеточным рецептором, а затем добавляют ДНК. В результате

получается компактная, плотно скрученная структура (тор), на внешней стороне которой располагаются сайты связывания с клеточным рецептором. К сожалению, подобный конъюгат, несмотря на свою специфичность, обладает низкой эффективностью трансфекции (искусственное введение в эукариотические клетки изолированных молекул ДНК). Все созданные к настоящему времени невирусные системы доставки имеют два основных недостатка: 1) низкая частота трансфекции, не позволяющая достичь нужного терапевтического эффекта; 2) непродолжительное время экспрессии «терапевтического» гена, не обеспечивающее эффективного лечения.

Возможно, подходящим терапевтическим вектором станет искусственная хромосома человека. Это связано с:

1) возможностью включения в нее протяженных сегментов чужеродной ДНК вместе с полным набором регуляторных элементов для одного или нескольких «терапевтических» генов;

2) возможностью использования геномного варианта «терапевтического» гена, обеспечивающего высокую эффективность его экспрессии;

3) стабильностью «терапевтического» гена и его длительной экспрессией как в пролиферирующей, так и в неделящейся клетке-мишени.

Кроме этих способов можно назвать и следующие методы генной терапии:

1. Активация предшественника лекарственного вещества («пролекарства»);

2. Лекарственные средства на основе олигонуклеотидов (синтез «антисмысловых» мРНК *in vivo* и «антисмысловых» олигонуклеотидов).

### **Контрольные вопросы**

1. Какие стратегии используются в генной терапии? Классификация генной терапии. Заместительная и корректирующая генотерапия.

2. Какие стадии проверки лекарственного препарата? Что такое генная терапия *ex vivo* и *in vivo*?

3. Какие существуют вирусные системы доставки генов? Опишите их преимущества и недостатки.

4. Опишите невирусные системы доставки генов.

### 3.2. Методы генной инженерии в сельском хозяйстве (трансгенные растения и животные) и пищевой промышленности (генно-модифицированные источники пищевой продукции)

#### Трансгенные растения

Одной из основных задач селекционеров было получение высокоурожайных сортов растений с повышенной пищевой ценностью. Наибольшее внимание уделялось при этом таким зерновым культурам, как кукуруза, пшеница и рис, однако были осуществлены программы и по скрещиванию других сельскохозяйственных и садовых культур. В качестве важного инструмента прямого генетического воздействия на растения применяется технология рекомбинантных ДНК, широко используемая в микробиологических системах. Можно привести три основных аргумента в пользу получения трансгенных растений. Во-первых, введение гена (генов) часто приводит к повышению сельскохозяйственной ценности и декоративных качеств культурных растений. Во-вторых, трансгенные растения могут служить живыми биореакторами при малозатратном производстве экономически важных белков или метаболитов. В-третьих, генетическая трансформация растений (трансгеноз) позволяет изучать действие генов в ходе развития растения и других биологических процессов. Некоторые генетические обусловленные признаки – такие как инсектицидная активность, устойчивость к вирусным заболеваниям и гербцидам, замедление старения, устойчивость к неблагоприятным условиям окружающей среды, измененная окраска цветков, повышенная пищевая ценность семян и самонесовместимость – могут быть приобретены растением при введении в него одного или нескольких генов.

Естественным путем трансформация растений осуществляется с помощью почвенных бактерий *Agrobacterium tumefaciens*.

*A. tumefaciens* вызывает образование опухолей стебля двудольных растений – так называемых корончатых галлов. Бактерии прикрепляются к клеткам растения в местах повреждений. Сайтами связывания на поверхности бактерий, видимо, являются молекулы  $\beta$ -глюкана и O-антигенной цепи липополисахарида внешней мембраны.

Бактерии связываются с рецепторами высшего растения, состоящими из белка и пектина; лектины в данном случае не имеют значения. Бактериальные сайты связывания и рецепторы растений являются конститивными, т.е. оба партнера обладают ими еще до момента взаимодействия. Первый шаг взаимодействия с растением – узнавание – следует рассматривать как специфическую адгезию растений. Как только бактерии прикрепилась к поверхности клеток растения, они начинают образовывать целлюлозные фибриллы. Эти фибриллы можно увидеть в сканирующем электронном микроскопе уже через 90 минут

после добавления бактерий к суспензии культуры клеток ткани моркови. К 10 часам инкубации фибриллы формируют сеть, покрывающую поверхность растительных клеток. Фибриллы служат более прочному закреплению бактерий на поверхности хозяина. За целлюлозные фибриллы могут зацепиться свободно плавающие клетки бактерий. Фиксируя их у поверхности растения, фибриллы увеличивают множественность заражения. В результате размножения образуются скопления бактерий на поверхности растения.

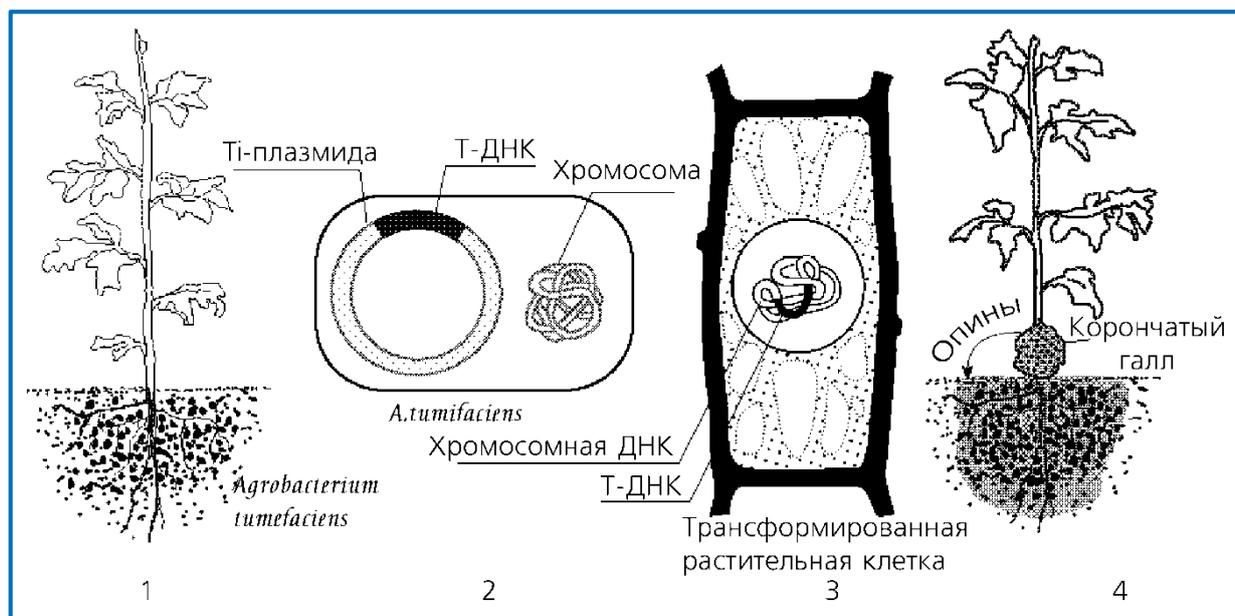
Клеточная стенка растения повреждается вследствие выделения бактериями пектолитических ферментов, что обеспечивает плотный контакт бактерий с плазмалеммой растительной клетки. Этот контакт необходим для передачи ДНК от бактерий в растительную клетку. Передача ДНК происходит без нарушения целостности мембраны растительной клетки, но требует определенного её состояния – компетентности.

Способность *A. tumefaciens* индуцировать у растений образование опухолей типа «корончатого галла» коррелирует с наличием у них Ti-плазмиды. Опухолевая трансформация проявляется в гипертрофии, возникающей после проникновения агробактерий в пораненные участки (сайты) растений. Трансформация является результатом стабильного ковалентного включения (инсерции или интеграции) сегмента («transferred» или T-ДНК) большой плазмиды (pTi – tumor inducing или pRi – root inducing) бактерий в ядерную ДНК растительной клетки.

Другой вид агробактерий – *A. rhizogenes* – вызывает заболевание, именуемое «бородатый корень», при котором в зоне повреждения корня образуется масса новых корешков. *A. rubi* обычно индуцируют неорганизованные опухоли (тератомы), штаммы *A. radiobacter* авирулентны.

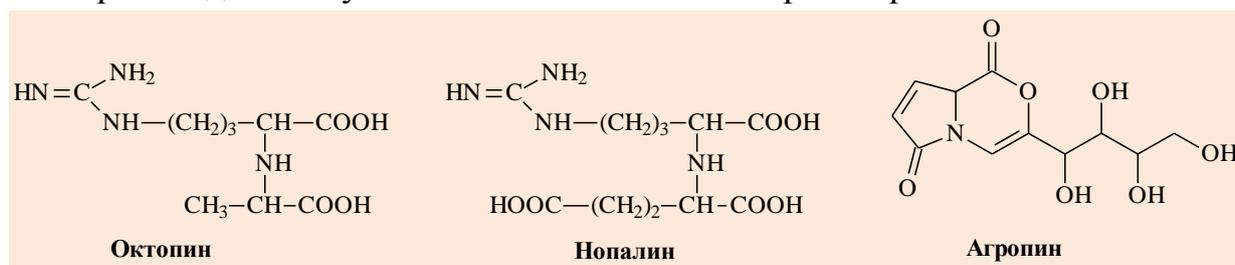
В отличие от большинства тканей, взятых из нормальных растений, трансформированные ткани в культуре *in vitro* в асептических (стерильных) условиях способны неограниченно расти в отсутствие экзогенно добавленных ауксинов и цитокининов. Кроме того, трансформированные ткани часто синтезируют одну или более групп соединений, названных опинами, которые обычно не обнаруживаются в нетрансформированных растительных тканях.

При поражении растения в нем начинает синтезироваться специфическое вещество. В ответ на этот химический сигнал *A. Tumefaciens* прикрепляется к мембране растительной клетки, после чего происходит перенос части (T-ДНК) бактериальной плазмиды (Ti-плазмиды) в ядро растительной клетки. T-ДНК встраивается в растительный геном и экспрессируется.



Генетическая колонизация растения *Agrobacterium tumefaciens*:  
 1 – агробактерии существуют в ризосфере; 2 – строение *A. tumefaciens*;  
 3 – встраивание Т-ДНК в геном; 4 – образование опухоли

Т-ДНК содержит гены, кодирующие ферменты синтеза фитогормонов, которые вызывают увеличение размеров растительных клеток и их пролиферацию. Кроме того, растительные клетки начинают синтезировать опин, кодируемый Т-ДНК, который может использоваться только *A. Tumefaciens*. **Опины** – это уникальные продукты конденсации аминокислот и сахаров. Например, при конденсации аргинина и пировиноградной кислоты образуется октоопин, аргинина и  $\alpha$ -кетоглутаральдегида – нопалин, а бициклического производного глутаминовой кислоты и сахара – агропин.



Опины могут использоваться как источник углерода (а иногда и как источник азота) любой *A. Tumefaciens*, которая несет в Ti-плазмиде ген(ы) катаболизма соответствующего опина, локализованные вне Т-ДНК. Большинство других исследованных почвенных микроорганизмов не способны использовать опины как источник углерода.

Таким образом, в процессе эволюции сформировался механизм превращения растительной клетки в «фабрику» по производству вещества – источника углерода и азота (опина) исключительно для нужд *A. Tumefaciens*.

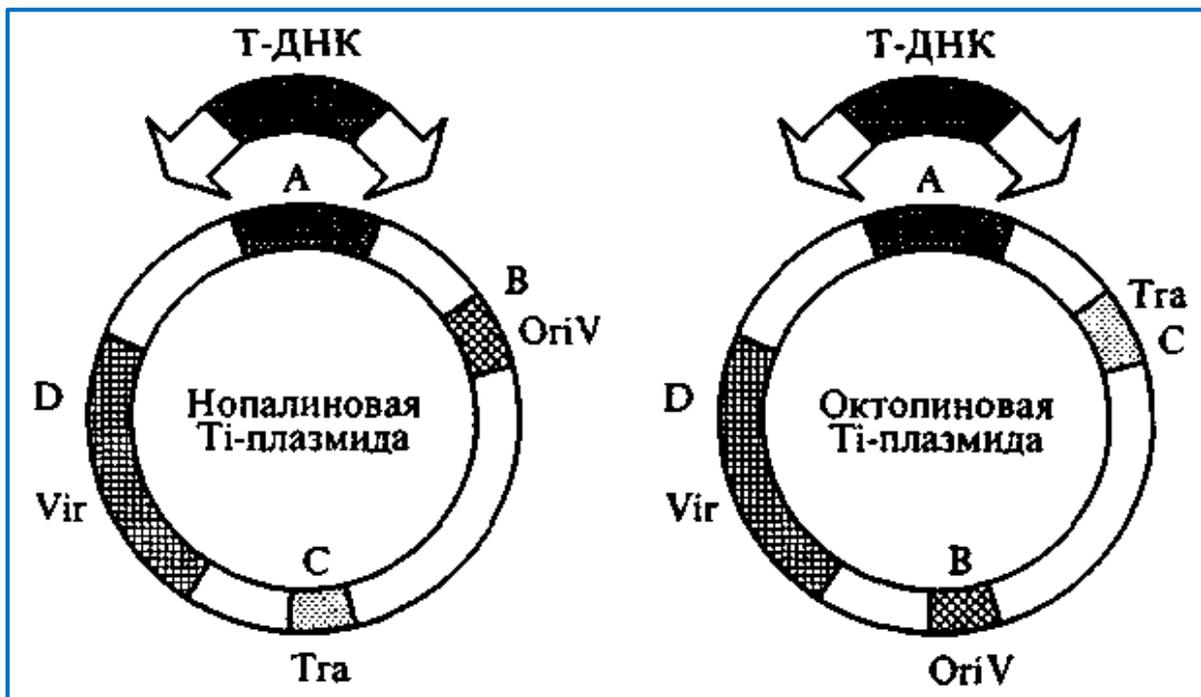
Чтобы использовать природную способность *A. Tumefaciens* проникать в растительные клетки для доставки в них клонированных генов, были созданы модифицированные Ti-плазмиды. Из T-ДНК удаляли гены фитогормонов и гены метаболизма опиона и встраивали такую измененную T-ДНК в плазмиду, способную стабильно существовать в *E. coli*. Встроенный в T-ДНК ген-мишень попадал вместе с ней в ядро растительной клетки-реципиента.

*Agrobacterium* имеет очень широкий круг растений-хозяев и может инфицировать практически все двудольные растения. Долгое время считалось, что однодольные растения не чувствительны к агробактериальной инфекции. В настоящее время показано, что при соблюдении определенных условий агробактерии могут инфицировать однодольные растения, в частности представителей таких семейств, как *Amaryllidaceae*, *Liliaceae*, *Gramineae*, *Iridaceae* и некоторых других. Однако существуют определенные вариации круга хозяев для различных штаммов *Agrobacterium*: некоторые штаммы способны вызывать галлообразование на отдельных видах растений, но не инфицируют другие. Различные сорта одного и того же растения также могут иметь различную чувствительность к данному бактериальному штамму.

Невозможность заражения в природе обуславливается отсутствием соответствующих рецепторов, необходимых для взаимодействия с бактериями. Другим фактором, препятствующим инфицированию однодольных агробактериями, возможно, является отсутствие в клетках растений низкомолекулярных индукторов вирулентности *Agrobacterium*, например ацетосирингона, которые обычно присутствуют в клеточном соке при поранении двудольных растений.

Подробная информация о структуре плазмид *Agrobacterium* получена путем их рестрикционного или физического картирования. В результате исследований обнаружено четыре основных области гомологии между октопиновой и нопалиновой плазмидами. Две консервативные (области А и D) вовлечены в онкогенность, еще одна (В) соответствует области контроля репликации плазмиды, в то время как последняя (С) кодирует функции конъюгативного переноса.

Таким образом, кроме T-ДНК в плазмидах имеются область, кодирующая функцию конъюгации (Tra), область репликации (Ori V) и область вирулентности (Vir). Последовательности Ti-плазмиды, фланкирующие T-ДНК (пограничные или концевые области), играют важную роль в интеграции в растительный геном и содержат несовершенные прямые повторы по 24–25 п. н. Делеция левой границы T-ДНК не влияет на опухолообразование, но удаление правой пограничной области приводит практически к полной утрате вирулентности. Показано, что делеция правого повтора или его части приводит к потере способности T-ДНК включаться в растительную ДНК.



Структура Ti-плазмид нопалинового и октопинового типа

Учитывая важную роль концов Т-области в переносе Т-ДНК, можно предположить, что любой сегмент ДНК, встроенный между этими концами, может быть перенесен в растения как часть Т-ДНК. Плазмиды модифицируют таким образом, чтобы удалить все онкогенные последовательности, так как они не принимают участие ни в переносе, ни в интеграции в геном клетки-хозяина. На место этих генов можно встроить чужеродную ДНК, а плазида теряет свои онкогенные свойства. Неонкогенные Т-ДНК, присутствующие в растениях-регенерантах, передаются согласно законам Менделя.

### Физические методы переноса генов в растительные клетки

Системы переноса генов с помощью *A. Tumefaciens* эффективно работают только в случае некоторых видов растений. В частности, однодольные растения, включая основные зерновые культуры (рис, пшеницу и кукурузу), практически не трансформируются в *A. Tumefaciens*. В таблице перечислен ряд методов трансформации однодольных растений. Некоторые из этих методов требуют удаления клеточной стенки с образованием протопластов. Последние поддерживают в культуре как независимо растущие клетки или в специальной питательной среде, где они образуют клеточные стенки; из таких клеток может быть регенерировано целое растение. Кроме того, разработаны методы трансформации, позволяющие вводить клонированный ген в небольшое число клеток растительной ткани, из которой можно регенерировать целое растение, обходясь без регенерации протопластов.

Метод	Комментарий
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 вируса	Неэффективный способ доставки ДНК в растительные клетки
Прямое введение генов в протопласты растений	Может использоваться для введения генов только в протопласты
Микроинъекции	Имеют ограниченное применение, поскольку одновременно инъекцию можно сделать только в одну клетку; манипуляцию 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

### Бомбардировка микрочастицами

Бомбардировка микрочастицами (или биолистика) – наиболее многообещающий метод введения ДНК в растительные клетки. Золотые или вольфрамовые сферические частицы диаметром 0,4–1,2 мкм покрывают ДНК осажденной  $\text{CaCl}_2$  спермидином или полиэтиленгликолем, и «выстреливают» ими в клетки из специального «ружья», приводимого в действие газами, образующимися при сгорании пороха сжатым воздухом или гелием. Частицы разгоняются до скорости 300–600 м/с и пробивают клеточную стенку и мембраны растительной клетки. При этом их плотность такова, что клетки практически не повреждаются. Попав в клетку, ДНК, покрывающая частицы, каким-то неизвестным способом интегрируется в растительную ДНК. Метод бомбардировки микрочастицами позволяет трансформировать растения самых разных видов, в том числе одностольные и хвойные, в которые не удается ввести ДНК с помощью *Agrobacterium*. Бомбардировку микрочастицами можно использовать также для введения чужеродной ДНК в суспензию растительных клеток, культуры клеток, незрелые зародыши, пыльцу широкого круга растений. Кроме того, с помощью этого метода были транспортированы гены в хлоропласты и митохондрии. На поверхности частиц можно осадить плазмидную ДНК, растворенную в буфере. Это позволяет повысить частоту трансформации путем увеличения количества плазмидной ДНК; однако, следует иметь в виду, что слишком большие ее количества могут оказаться губительными для клетки.

## **Генная инженерия растений: применение**

### ***Растения, устойчивые к насекомым-вредителям***

Для создания растений, устойчивых к насекомым-вредителям, с помощью генноинженерных методов были разработаны различные стратегии. В одном случае использовали ген инсектицидного протоксина, продуцируемого одним из подвидов *Bacillus thuringiensis*. В другом – гены растительных белков типа ингибиторов амилазы или протеиназ, эффективных в отношении широкого круга насекомых. Насекомое, в организм которого попадал один из этих ингибиторов, было не способно переваривать растительную пищу, потому что ингибиторы препятствовали гидролизу крахмала или растительных белков.

Протоксин *B. Thuringiensis* – это безопасное средство защиты растений: попадая в окружающую среду, он теряет активность. К сожалению, множество вредителей хлебных злаков питаются внутренними тканями растения, так что препараты *B. Thuringiensis*, распыляемые на поверхность растения, оказываются малоэффективными. Эту проблему можно решить, если обеспечить экспрессию генов токсинов в самих растениях. Распылять инсектициды в этом случае не потребуется, и токсины не попадут в окружающую среду, кроме того, не возникнет проблем, связанных с ограничением времени их действия в результате разложения.

### ***Растения, устойчивые к вирусам***

Вирусы растений часто причиняют значительный ущерб растениям и существенно снижают урожай. Чтобы не прибегать к обработке культур химическими препаратами, селекционеры попытались перенести природные гены устойчивости к вирусам от одной линии растений к другой. Однако устойчивые растения часто вновь становятся чувствительными, а устойчивость к одному вирусу не гарантирует устойчивости к другим. Природный иммунитет к вирусным инфекциям обуславливается разными причинами: блокированием проникновения вируса в растение, предотвращением его распространения, подавлением симптомов вирусной инфекции. Чтобы получить растения, устойчивые к вирусам, проводили их «иммунизацию» вирусными генами, кодирующими белки оболочки, другими вирусными генами или антисмысловыми последовательностями вирусного генома. Если в трансгенном растении экспрессируется ген, кодирующий белок оболочки вируса, который обычно инфицирует это растение (а данный белок зачастую является основным белковым компонентом вируса), то способность вируса проникать в растение и распространяться в нем часто значительно уменьшается. Механизм ингибирования пролиферации вируса в присутствии генов белка оболочки точно не установлен, однако ясно, что противовирусное действие начинает проявляться на ранних стадиях репликации вируса, так что вирусные частицы не образуются. Это снижает вероятность

возникновения спонтанных вирусных мутантов, способных к репликации в присутствии вирусного белка оболочки. С помощью этого подхода были получены устойчивые к различным вирусам трансгенные растения множества различных зерновых культур. И хотя абсолютной устойчивости при этом достичь не удавалось, ее уровень был весьма высок. Более того, обнаружилось, что ген белка оболочки одного вируса иногда обеспечивает устойчивость к широкому кругу неродственных вирусов. Ценность подхода повышается и благодаря тому, что трансгенные растения развиваются одинаково как в полевых условиях, так и в лабораторных.

Защита растений от патогенных вирусов может осуществляться не только их «иммунизацией» генами вирусных белков, но и при участии противовирусных белков, синтезируемых самими растениями. Например, в клеточной стенке фитоллакки американской (*Phitolacca amerikano*) присутствуют три разных противовирусных белка: РАР, синтезируемый в листьях весной, РАРII, обнаруживаемый в листьях летом, и РАР-S, содержащийся в семенах. Эти белки легко выделить из водных экстрактов измельченных тканей растения. Если небольшое количество РАР нанести на листья других растений, то последние также окажутся устойчивыми к нескольким вирусам. Таким образом, ген белка РАР вполне можно использовать для получения трансгенных растений, устойчивых к широкому спектру вирусов растений.

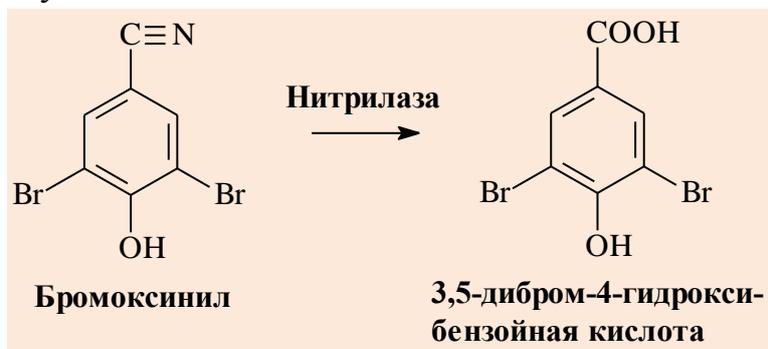
### ***Растения, устойчивые к гербицидам***

Несмотря на то, что на производство более 100 различных химических гербицидов во всем мире ежегодно расходуется 10 млрд долларов, примерно 10 % урожая теряется из-за большого количества сорняков. Кроме того, многие гербициды оказывают одинаковое действие на сорняки и сельскохозяйственные культуры; нередко обработку полей необходимо проводить еще до появления сорняков, а некоторые гербициды накапливаются в окружающей среде. Чтобы решить хотя бы некоторые из этих задач, можно попытаться создать сельскохозяйственные культуры, устойчивые к гербицидам. Для этого можно:

- уменьшить поглощение гербицида растением;
- обеспечить синтез белка, чувствительного к гербициду, в таком количестве, чтобы его хватало на выполнение присущих ему функций в присутствии гербицида;
- уменьшить способность белка, чувствительного к гербициду, к связыванию с ним;
- обеспечить инактивацию гербицида в растении в ходе метаболизма.

Например, способ приобретения устойчивости – с помощью инактивации гербицида – был реализован для бромоксирила (3,5-дибром-4-гидроксибензонитрила) – гербицида, который ингибирует фотосинтез. Устой-

чивые растения создавали путем введения в их геном бактериального гена, кодирующего нитрилазу, которая инактивирует бромоксинил еще до того, как он начинает действовать. Из почвенной бактерии *Klebsiella ozaenae* был выделен ген нитрилазы, помещен под контроль светочувствительного промотора гена малой субъединицы рибулозобисфосфат-карбоксилазы и встроен в геном табака. Трансгенные растения синтезировали активную нитрилазу и были устойчивы к бромоксинилу.



### ***Растения, устойчивые к грибам и бактериям***

Фитопатогенные грибы наносят весьма ощутимый вред сельскохозяйственным культурам. Поэтому очень важно выработать простые, недорогие, эффективные и безопасные для окружающей среды нехимические методы защиты сельскохозяйственных культур от грибов. Часто в ответ на проникновение патогенов растения начинают синтезировать группу специфических PR-белков. В эту группу входят  $\beta$ -1,3-глюконаза, хитиназа, тауматинподобные белки и ингибиторы протеиназ; все они так или иначе воздействуют на патогены. Имея это в виду, ученые попытались вывести растения, устойчивые к болезнетворным грибам, способные конститутивно экспрессировать гены одного или нескольких PR-белков. Так были получены трансгенные растения, синтезирующие в большом количестве хитиназу, фермент, гидролизующий  $\beta$ -1,4-связи в молекуле N-ацетил-D-глюкозамина, основного компонента клеточной стенки грибов. Среди таких растений были рис, табак и канола.

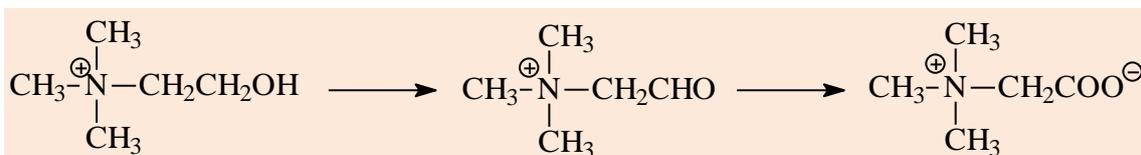
### ***Растения, противостоящие неблагоприятным условиям и старению***

В отличие от большинства животных растения физически не могут защитить себя от неблагоприятных воздействий со стороны окружающей среды: высокой освещенности, ультрафиолетового облучения, высоких и низких температур и концентрации солей и т.д., поэтому в процессе эволюции у них выработались физиологические механизмы противодействия экстремальным условиям. Одним из нежелательных последствий физиологического стресса является образование радикалов кислорода. Разумно было предположить, что если удастся создать растения, толерантные к большим концентрациям радикалов

кислорода, то такие растения смогут противостоять различным неблагоприятным условиям.

**Окислительный стресс.** Наиболее распространенным радикалом кислорода, представляющим опасность для растений, является супероксид-анион  $O_2^{\cdot-}$ . Фермент супероксид-дисмутаза нейтрализует это соединение, превращая его в пероксид водорода, который в свою очередь превращается в воду любой из множества клеточных пероксидаз или каталаз. В одном из экспериментов были получены трансформированные растения табака, несущие ген супероксид-дисмутаза под контролем 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты. Они синтезировали супероксид-дисмутазу и были устойчивыми к повреждающему действию радикалов кислорода. Повышение уровня супероксид-дисмутаза дает еще одно преимущество: растения становятся более устойчивыми к гербициду метилвиологену и к световому воздействию. Супероксид-дисмутаза способствует также сохранению срезанных растений при транспортировке. Их увядание также происходит в результате образования радикалов кислорода. Если бы удалось создать трансгенные растения, содержащие ген супероксид-дисмутаза, который находится под контролем промотора, специфичного для цветков, это могло бы отсрочить их увядание.

**Солевой стресс.** Многие растения произрастают в регионах, где часто бывают засухи или где сильно засолена почва. Чтобы приспособиться к этим условиям, они синтезируют низкомолекулярные нетоксичные вещества – осмопротекторы. Эти вещества способствуют поглощению и удержанию воды, а также предотвращают разрушение макромолекул, присутствующих в клетках растений, под действием высоких концентраций солей. Осмопротекторами являются такие хорошо известные соединения, как сахара, спирты, пролин и четвертичные соединения аммиака. Одним из высокоактивных осмолитиков является бетаин, который накапливается в некоторых растениях во время засухи или при высокой засоленности. Некоторые важные сельскохозяйственные культуры, в том числе картофель, тис, томаты, не способны накапливать бетаин. Защитить такие растения можно было бы введением в них генов, кодирующих ферменты биосинтеза бетаина. Как у растений, так и у бактерий бетаин синтезируется в две стадии.



**Превращение холина в бетаин**

**Созревание плодов.** Серьезной проблемой при транспортировке фруктов и овощей является их преждевременное созревание и размягчение. Установлено, что при созревании плодов в растениях активируются специфические гены, кодирующие ферменты целлюлазу и полигалактуроназу, и если подавить экспрессию одного или нескольких из них, то созревание может начаться позже. Для инактивации указанных генов были созданы трансгенные растения, в которых синтезировались антисмысловые РНК-версии этих генов. При введении гена, кодирующего антисмысловую полигалактуроназную РНК, в растения томата-культуры, ежегодно приносящей в США 1,3 млрд долларов прибыли, и количество соответствующей мРНК, и активность фермента уменьшилась на 90 %. Департамент по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств США пришел к выводу, что трансформированные томаты столь же безопасны, как и полученные обычным скрещиванием, а потому при их продаже нет необходимости указывать их происхождение.

### ***Повышение эффективности биологической азотфиксации***

Хорошо изучен фермент нитрогеназа, ответственный за восстановление молекулярного азота до аммония. Структура нитрогеназы одинакова у всех азотфиксирующих организмов. При фиксации азота неизменным физиологическим условием является защита нитрогеназы от разрушения под действием кислорода. Лучше всех среди азотфиксаторов изучены ризобии, образующие симбиоз с бобовыми растениями, и свободноживущая бактерия *Klebsiella pneumoniae*. Установлено, что у этих бактерий за фиксацию азота ответственно 17 генов – так называемых *nif*-генов. Все эти гены сцеплены друг с другом и расположены в хромосоме между генами ферментов биосинтеза гистидина и генами, определяющими усвоение шикимовой кислоты. У быстрорастущей ризобии *nif*-гены существуют в форме мегаплазмиды, содержащей 200–300 тысяч пар нуклеотидов.

Среди генов азотфиксации выявлены гены, контролирующие структуру нитрогеназы, белковый фактор, принимающий участие в транспорте электронов, регуляторные гены. Регуляция генов азотфиксации довольно сложна, поэтому генноинженерный перенос азотфиксирующей функции от бактерий непосредственно высшим растениям в настоящее время уже не обсуждается. Как показали эксперименты, даже в самом простом эукариотическом организме дрожжах не удалось добиться экспрессии *nif*-генов, хотя они и сохранялись в течение 50 генераций.

Эти опыты показали, что диазотрофность (азотфиксация) свойственна исключительно прокариотическим организмам, и *nif*-гены не смогли преодолеть барьер, разделяющий прокариоты и эукариоты, из-за слишком сложной своей структуры и регуляции генами, расположенными вне *nif*-области. Возможно,

более удачным окажется перенос *nif*-генов с помощью *Ti*-плазмид в хлоропласты, поскольку механизмы экспрессии генов в хлоропластах и в клетках прокариот близки. В любом случае нитрогеназа должна быть защищена от ингибирующего действия кислорода. Кроме того, фиксация атмосферного азота – очень энергоемкий процесс. Вряд ли растение под влиянием *nif*-генов может так кардинально изменить свой метаболизм, чтобы создать все эти условия. Хотя не исключено, что в будущем методами генетической инженерии можно будет создать более экономно работающий нитрогеназный комплекс.

Более реально использование генноинженерных методов для решения следующих задач: повышение способности ризобии колонизировать бобовые растения, повышение эффективности фиксации и ассимиляции азота путем воздействия на генетический механизм, создание новых азотфиксирующих микроорганизмов путем введения в них *nif*-генов, передача способности к симбиозу от бобовых растений к другим.

Первостепенной задачей генетической инженерии для повышения эффективности биологической фиксации азота является создание штаммов ризобии с усиленной азотфиксацией и колонизирующей способностью. Колонизация бобовых растений ризобиями протекает очень медленно, лишь единичные из них дают начало клубенькам. Это происходит потому, что местом инвазии ризобии является только одна небольшая область между точкой роста корня и ближайшим к ней корневым волоском, находящимся на стадии формирования. Все остальные части корня и развившиеся корневые волоски растения нечувствительны к колонизации. В ряде случаев сформировавшиеся клубеньки оказываются неспособными фиксировать азот, что зависит от многих растительных генов (выявлено не менее пяти), в частности от неблагоприятного сочетания двух рецессивных генов.

Традиционными методами генетики и селекции удалось получить лабораторные штаммы ризобий с более высокой колонизирующей способностью. Но они в полевых условиях испытывают конкуренцию со стороны местных штаммов. Повышение их конкурентоспособности, видимо, можно осуществить генноинженерными методами. Повышение эффективности процесса азотфиксации возможно применением генноинженерных приемов, основанных на увеличении копий гена, усилении транскрипции тех генов, продукты которых образуют «узкое» место в каскадном механизме азотфиксации, путем введения более сильных промоторов и т.п. Важно повышение коэффициента полезного действия самой нитрогеназной системы, осуществляющей непосредственное восстановление молекулярного азота в аммиак.

### ***Повышение эффективности фотосинтеза***

C<sub>4</sub>-растения характеризуются высокими темпами роста и скоростью фотосинтеза, у них практически отсутствует видимое фотодыхание.

**Дополнение.** C<sub>4</sub>-фотосинтез, или цикл Хэтча-Слэка – путь связывания углерода, характерный для высших растений, первым продуктом которого является четырехуглеродная щавелевоуксусная кислота, а не трехуглеродная 3-фосфоглицериновая кислота, как у большинства растений с обычным C<sub>3</sub>-фотосинтезом.

У большинства сельскохозяйственных культур, относящихся к C<sub>3</sub>-растениям, высокая интенсивность фотодыхания. Фотосинтез и фотодыхание – тесно связанные процессы, в основе которых лежит бифункциональная активность одного и того же ключевого фермента – рибулозобисфосфаткарбоксилазы (РубФК). РубФК-карбоксилаза может присоединять не только CO<sub>2</sub>, но и O<sub>2</sub>, то есть осуществляет реакции карбоксилирования и оксигенирования. При оксигенировании РубФК образуется фосфогликолат, который служит основным субстратом фотодыхания – процесса выброса CO<sub>2</sub> на свету, в результате чего теряется часть фотосинтетических продуктов. Низкое фотодыхание у C<sub>4</sub>-растений объясняется не отсутствием ферментов гликолатного пути, а ограничением оксигеназной реакции, а также реассимиляцией CO<sub>2</sub> фотодыхания.

Одной из задач, стоящих перед генетической инженерией, является исследование возможности создания РубФК с преобладающей карбоксилазной активностью.

### ***Проблемы биобезопасности трансгенных растений***

Одним из главных возражений против употребления «трансгенных» продуктов питания является наличие во многих из них генов устойчивости к антибиотикам (в частности, к канамицину), которые содержались в исходной конструкции ДНК в качестве селективных.

Предполагается, что эти гены устойчивости могут при переваривании пищи передаваться эндогенной микрофлоре, в том числе патогенной, в результате чего микробы могут приобрести резистентность к данному антибиотику. Однако в реальности вероятность такого события ничтожно мала, так как многочисленные эксперименты и наблюдения в природе относительно подобного горизонтального переноса генов до сих пор давали только отрицательные результаты.

Не стоит забывать, что встраиваемые в растения гены устойчивости «настроены» для экспрессии лишь в эукариотических, но не бактериальных клетках. Надо учесть и то, что эти селективные гены взяты из природных популяций микроорганизмов, где они сейчас широко распространены в результате

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

В большинстве случаев маркерные гены устойчивости к антибиотикам сейчас заменяют на гены устойчивости к гербицидам. Правда, применение «гербицидных» генов также встречает возражения, но уже защитников окружающей среды. Предложено несколько способов избирательной элиминации маркерного гена после получения желаемого трансгенного растения, когда он фактически уже не нужен.

Очень перспективным представляется замена селективных генов на репортерные при отборе трансгенных форм растений, либо использование альтернативных селективных генов, таких как гены синтеза фитогормонов или гидролиза особых форм полисахаридов при выращивании растений в культуральной среде. Таким образом, даже эта виртуальная опасность, связанная с генами устойчивости к антибиотику, в скором времени перестанет существовать.

Что касается возможной токсичности или аллергенности трансгенных растений, то здесь применяют те же жесткие стандарты, как и для полученных традиционным путем новых сортов культурных растений или новых видов продуктов питания. Никаких особых отличий трансгенных растений от обычных по этим параметрам ожидать не приходится (разве что в лучшую сторону при блокировании синтеза токсинов или аллергенов), да и действительно, как правило, не наблюдается на практике.

Проблема возможного ущерба для окружающей среды имеет несколько аспектов. Во-первых, существует опасение, что устойчивые к гербицидам культурные растения могут при межвидовом опылении передавать эти гены близкородственным сорнякам, которые могут превратиться в неистребимые суперсорняки (superweeds). Хотя вероятность такого нежелательного развития событий для большинства сельскохозяйственных культур очень мала, генные инженеры и ученые-аграрии активно разрабатывают подходы для исключения подобной опасности. Здесь, правда, надо отметить, что данный вопрос также не нов, так как в практике сельского хозяйства уже давно используется ряд устойчивых к гербицидам сортов, полученных путем обычной селекции. При этом никакой экологической катастрофы широкое использование таких устойчивых сортов до сих пор не вызвало.

Тем не менее и в этом случае, чтобы отвести любые возражения от трансгенных растений, пробуют, например, вводить в растения не один, а сразу не-

сколько генов устойчивости к разным гербицидам. Передача нескольких генов сорнякам гораздо менее вероятна, чем одного гена. Кроме того, мультигербицидная устойчивость позволит чередовать разные гербициды при обработке посевов, что не даст возможности для распространения какого-либо определенного гена устойчивости в сорняках.

Предлагается также вводить гены устойчивости не в ядерный, а в хлоропластный геном. Это может предотвратить нежелательный дрейф генов с помощью пыльцы, так как хлоропласты наследуются только по материнской линии.

Еще один генно-инженерный путь борьбы с сорняками без использования генов резистентности к гербицидам вообще – биотрансгенный. Речь идет об использовании мелких животных, например кроликов, для поедания сорняков на полях. При этом, чтобы оградить от поедания культурные растения, в них можно ввести какой-либо ген, делающий их непривлекательными (запах, вкус) для данного животного. Такой биотрансгенный подход сразу снял бы большинство выдвигаемых сейчас возражений против трансгенных культур.

Близкие, по сути, экологические возражения касаются трансгенных растений со встроенными «инсектицидными» генами, способными, как считают, спровоцировать у насекомых-вредителей возникновение массовой резистентности. Здесь также предложены действенные способы для уменьшения этой опасности, например использование генов нескольких разных токсинов и/или индукцибельных промоторов, быстро активирующихся при нападении насекомых на растение. Данная проблема, в общем, не нова, так как многие из инсектицидов, используемых сейчас на «генном уровне», давно применяют в виде чистого вещества для опрыскивания посевов.

Еще одно нежелательное следствие использования трансгенных растений с генами инсектицидов заключается в том, что пыльца этих растений может быть токсичной и для полезных насекомых, которые данной пылью питаются. Некоторые экспериментальные данные говорят о том, что такая опасность действительно существует, хотя о ее возможных масштабах говорить пока трудно. Однако здесь уже предложены и испытаны адекватные генно-инженерные решения, например использование трансгеноза через хлоропластную ДНК, или промоторов, не работающих в пыльце.

### **Трансгенные животные**

Для выведения улучшенных пород домашних животных и птиц проводят множество раундов скрещиваний и отбора, каждый раз используя в качестве производителей животных с наилучшими характеристиками. В результате со временем можно получать более или менее чистые линии высокопродуктивных пород животных. Стратегия скрещивания и отбора, требующая больших временных и материальных затрат, оказалась тем не менее исключительно успеш-

ной, и сегодня почти все аспекты биологических основ выведения новых пород домашнего скота могут быть к ней сведены. Однако после того, как эффективная линия получена, вводить новые признаки методом скрещивания и отбора становится все труднее. Так, линия с новым «ценным» геном может нести также и «вредные» гены, вследствие чего потомки могут оказаться менее продуктивными. Чтобы быть уверенными в том, что новая, улучшенная линия сохранит исходные полезные признаки и приобретет новые, необходимо разработать абсолютно новую стратегию.

Успешные эксперименты по введению чужеродных генов в клетки млекопитающих и возможность создания генетически идентичных животных путем переноса ядра из эмбриональной клетки в яйцеклетку с удаленным ядром (перенос ядра, клонирование) позволили включать в хромосомную ДНК высших животных отдельные функциональные гены или целые их кластеры. Используемая стратегия состоит в следующем:

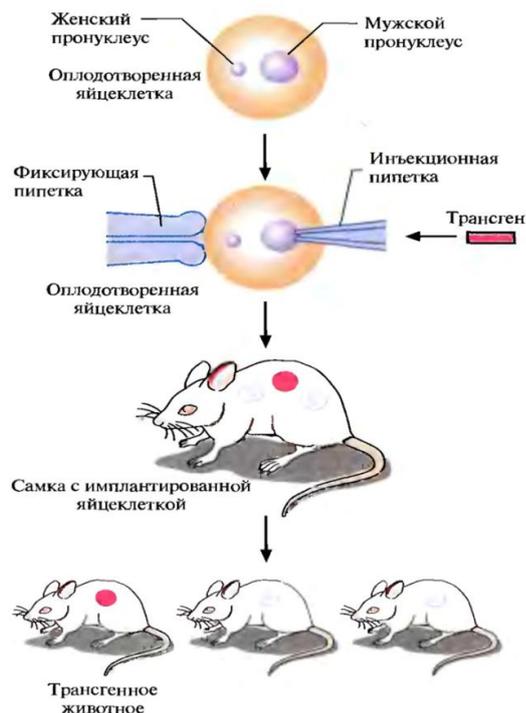
- Клонлируемый ген вводят в ядро оплодотворенной яйцеклетки.
- Иннокулированные оплодотворенные яйцеклетки имплантируют в реципиентную женскую особь (поскольку успешное завершение развития эмбриона млекопитающих в иных условиях невозможно).
- Отбирают потомков, развившихся из имплантированных яйцеклеток, которые содержат клонированный ген во всех клетках.
- Скрещивают животных, которые несут клонированный ген в клетках зародышевой линии, и получают новую генетическую линию.

Трансгенные технологии разрабатывались и совершенствовались на лабораторных мышах. Введение чужеродной ДНК мышам можно осуществить разными методами:

1. Использование ретровирусных векторов, инфицирующих клетки эмбриона на ранних стадиях развития перед имплантацией эмбриона в самку-реципиента.
2. Микроинъекцией в увеличенное ядро спермия (мужской пронуклеас) оплодотворенной яйцеклетки.
3. Введением генетически модифицированных эмбриональных стволовых клеток в предимплантированный эмбрион на ранних стадиях развития.

Плюрипотентность можно выявить, если перенести ядро тестируемой клетки в яйцеклетку с удаленным ядром, а затем исследовать способность последней к развитию и образованию жизнеспособного потомства. Всем известная овца Долли была клонирована с помощью переноса ядра клетки молочной железы (вымени) взрослого животного. Так впервые была доказана плюрипотентность ядра дифференцированной взрослой клетки. Впрочем, нельзя исклю-

читать, что на самом деле донорское ядро было взято из недифференцированной клетки, присутствовавшей в эпителии молочной железы организма-донора.

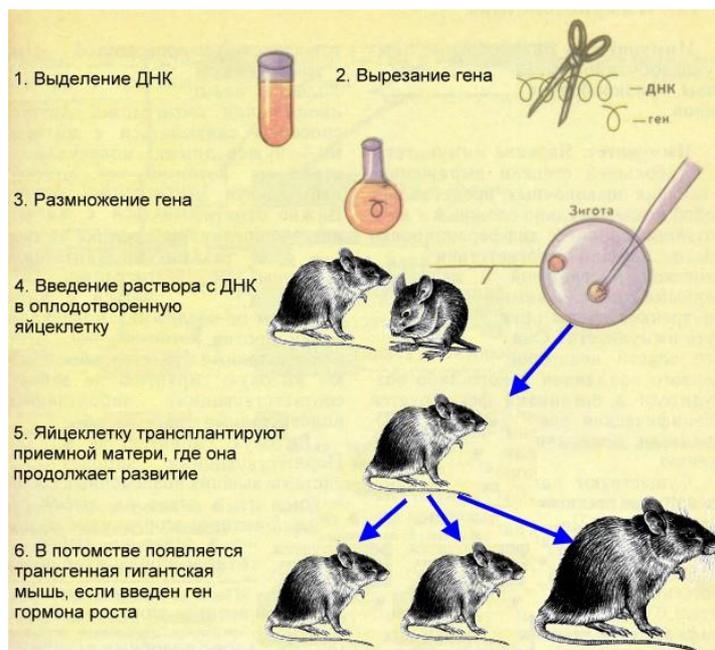


олиго-dT

нетических болезней человека, как болезнь Альцгеймера, артрит, мышечная дистрофия, образование опухолей, гипертония, нейродегенеративные нарушения, дисфункция эндокринной системы, сердечно-сосудистые заболевания и многие другие.

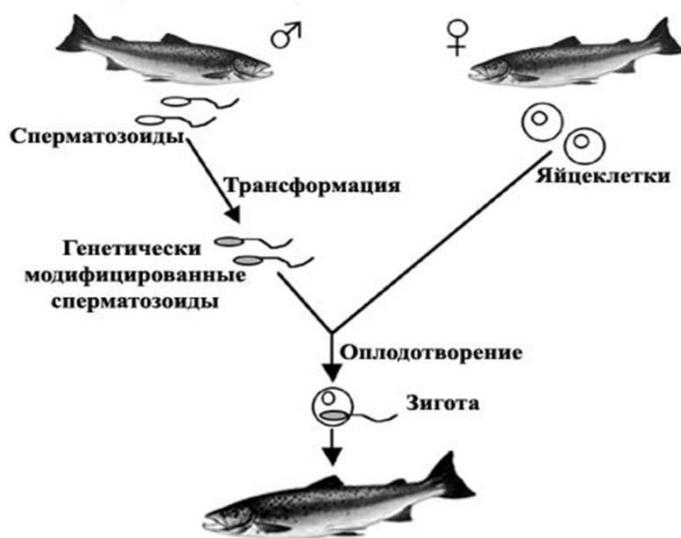
### Трансгенные мыши: применение

Трансгенные мыши могут служить модельными системами для изучения болезней человека и тест-системами для исследования возможности синтеза продуктов, представляющих интерес для медицины. Используя целых животных, можно моделировать и возникновение патологии, и ее развитие. Однако мышь – не человек, хотя она тоже относится к классу млекопитающих, поэтому не всегда можно экстраполировать на человека в том, что касается медицинских аспектов. Тем не менее в некоторых случаях они позволяют выявить ключевые моменты этиологии сложной болезни. Принимая во внимание все это, ученые разработали «мышинные» модели, таких генетических



В последние годы при создании трансгенных животных используют также *эмбриональные стволовые клетки*, которые берутся из эмбриона на самых ранних стадиях развития (из бластоцисты, состоящей из около 150 клеток). Эти клетки могут дифференцироваться в любые типы клеток многоклеточного организма.

Эмбриональные стволовые клетки можно культивировать *in vitro* в течение длительного времени и вводить в них целевые трансгены с помощью вирусных векторов. После чего клетки со встроенными чужеродными генами можно вводить в другие эмбрионы на стадии бластоцисты для получения трансгенных животных.



мРНК

**Трансгенный рогатый скот.** Если предполагается использовать молочную железу в качестве «биореактора», то наиболее предпочтительным животным для трансгеноза является крупный рогатый скот, который ежегодно дает до 10000 л молока, содержащего 35 г белка на 1 л. Если в молоке будет содержаться такое количество рекомбинантного белка и эффективность его очистки составит 50 %, то от 20 трансгенных коров можно будет получать примерно 100 кг такого белка в год. По случайному совпадению, именно столько белка С, использующегося для предотвращения тромбообразования, требуется ежегодно. С другой стороны, одной трансгенной коровы будет более чем достаточно для получения требуемого ежегодно количества фактора IX (фактора Кристмаса) каскадного механизма свертывания крови, который вводят больным гемофилией для повышения свертываемости крови.

Для создания трансгенных коров использовали модифицированную схему трансгеноза мышей методом микроинъекций ДНК. В тестовых экспериментах из пула в 2470 ооцитов были получены два трансгенных теленка. Этот результат указывает на результативность описанного подхода, но также и на его низ-

кую эффективность. Исследования в этой области продолжаются, и есть надежда на усовершенствование методики трансгеноза.



**«Популярные» добавки на основе генетически модифицированных компонентов:**

Здесь и далее в расшифровке E-кодов использованы: дополнение к «Медико-биологическим требованиям и санитарным нормам качества продовольственного сырья и пищевых продуктов» (№5061-89). М., Госкомитет санитарно-эпидемиологического надзора Российской Федерации, 1994.

**E-101** – Рибофлавин (B2) (Riboflavin; Riboflavin-5-Phosphate Sodium) и E-101A, сделанный из ГМ-микроорганизмов, одобрен для продажи в ряде стран. Добавляется в каши, безалкогольные напитки, детское питание и продукты для похудения;

**E-150** – Карамель (Plain Caramel) и ксантан (E-415, Xanthan Gum) произведены из ГИ-зерна;

**E-322** – Лецитин производится из сои. Лецитин связывает воду и жиры вместе и используется как жировой элемент в молочных смесях, печеньях, шоколаде, хлебе и т.д. (Это именно тот самый лецитин, который ныне усиленно рекламируется по TV в качестве полезного для роста и умственного развития детей. Помните, что лецитин – это только связующая основа (как желатин) и ничего более.

**Добавки с высокой степенью вероятности содержания ГМ-компонентов:**

**E-153** – Vegetable Carbon (Уголь растительный);

**E-160d** – Annatto, Bixin, Norbixin (Аннато, биксин, норбиксин);

**E-161c** – Paprika extract, Capsanthin, Capsorubin (Экстракт паприки, капсантин, капсорубин);

**E-308** – Synthetic Gamma-tocopherol;

**E-309** – Synthetic Delta-tocopherol;

**E-471** – Mono- and Diglycerides of Fatty Acids (Моно- и диглицериды жирных кислот);

**E-472a** – Acetic Acid Esters of Mono- and Diglycerides of Fatty Acids (Эфиры моно- и диглицеридов уксусной и жирных кислот);

**E-473** – Sucrose Esters of Fatty Acids (Эфиры сахарозы и жирных кислот);

**E-475** – Polyglycerol Esters of Fatty Acids (Эфиры полиглицеридов и жирных кислот);

**E-476** – Polyglycerol Polyricinoleate (Полиглицерин полирицинолеаты);

**E-477** – Propane-1, 2-diol Esters of Fatty Acids (Пропан-1, 2-диоловые эфиры жирных кислот);

**E-479b** – Thermally Oxidized Soya Bean Oil Interacted with Mono- and Diglycerides of Fatty Acids (Термически окисленное соевое и бобовое масло с моно- и диглицеридами жирных кислот);

**E-570** – Fatty Acids (Жирные кислоты);

**E-951** – Aspartame (Аспартам или Нутросвит).

### **Контрольные вопросы**

1. Почему Ti-плазида из почвенных бактерий *Agrobacterium tumefaciens* подходит для создания вектора – переносчика чужеродного гена в хромосомную ДНК растения?
2. Опишите физические методы переноса генов в растительные клетки.
3. Предложите стратегию создания растений, устойчивых к насекомым-вредителям.
4. Предложите стратегию защиты растения от повреждения вирусами.
5. Опишите способы создания растений, устойчивых к гербицидам.
6. Как следует изменить растение, чтобы обеспечить его защиту от патогенных почвенных грибов и бактерий?
7. Какие подходы применяются для создания растений, противостоящих неблагоприятным условиям и старению?
8. Какая существует необходимость в выведении трансгенных животных?

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Б. Глик, Дж. Пастернак. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Москва: «Мир». 2002.
2. М. Дженкинс. 101 ключевая идея: генетика. Москва: «Фаир-пресс». 2002.
3. М. Д. Франк-Каменецкий. Век ДНК. Москва: «Издательство КДУ». 2004.
4. В. А. Быков, М. Н. Манаков, В. И. Панфилов, А. А. Свитцов, Н. В. Тарасова. Биотехнология: производство белковых веществ. Москва: «Высшая школа». 1987.
5. Н. С. Егоров, А. В. Олескин, В. Д. Самуилов. Биотехнология: проблемы и перспективы. Москва: «Высшая школа». 1987.
6. Т. А. Егорова, С. М. Клунова, Е. А. Живухина. Основы биотехнологии. Москва: «Academa». 2003.
7. И. В. Березин, И. А. Крылов и др. Биотехнология: микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов. Москва: «Высшая школа». 1987.
8. А. М. Безбородов. Биотехнология продуктов микробного синтеза. Ферментативный катализ, как альтернатива органического синтеза. Москва: Агропромиздат, 1991.
9. Н. В. Загоскина и др. Биотехнология: теория и практика: учебное пособие. Москва: Оникс, 2009.
10. С. Н. Загребельный. Биотехнология: учебное пособие.; М-во образования и науки РФ, Новосибирский гос. ун-т. Новосибирск, 2005.

*Учебное издание*

**Толмачева Ирина Анатольевна**

## **Биотехнология**

Учебное пособие

Редактор *А. С. Серебренников*  
Корректор *С. А. Вороненко*  
Компьютерная верстка: *И. А. Толмачева*

---

Объем данных 4,26 Мб  
Подписано к использованию 05.08.2022

---

Размещено в открытом доступе  
на сайте [www.psu.ru](http://www.psu.ru)  
в разделе НАУКА / Электронные публикации  
и в электронной мультимедийной библиотеке ELiS

Издательский центр  
Пермского государственного  
национального исследовательского университета  
614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15